

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Vlastimil Navrátil

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra biologie a environmentálních studií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Antimikrobiální účinky přírodních látek
Antimicrobial Effects of Natural Substances

Vlastimil Navrátil

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.
Studijní program: Specializace v pedagogice
Studijní obor: Biologie, geologie a enviromentalistika se zaměřením na vzdělávání
– Výchova ke zdraví se zaměřením na vzdělávání

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Antimikrobiální účinky přírodních látek potvrzuji, že jsem ji vypracoval pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 13. 7. 2018

Rád bych poděkoval své vedoucí bakalářské práce paní RNDr. Lence Pavlasové, Ph.D. za úžasnou spolupráci, cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování mé práce a provádění pokusu. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia. V neposlední řadě také děkuji Kristýně Sůvové a Tomáši Halvovi za ochotu a čas strávený nad jednotlivými texty této práce.

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na antimikrobiální účinnost přírodních látek běžně využívaných ve většině domácností.

V teoretické části jsou popsány základní účinné látky přírodního původu, jejich antimikrobiální účinky a příklady rostlin, které tyto látky obsahují. Dále je zde zmíněna agarová difuzní metoda a základní informace o kultivačních médiích použitých v průběhu testování.

V praktické části jsou detailně rozepsány jednotlivé fáze pokusu včetně vyhodnocení úspěšnosti dvou navržených metod aplikace přírodních látek. V závěru praktické část jsou metodická doporučení k navrženému pokusu.

KLÍČOVÁ SLOVA

agarová difuzní metoda, antimikrobiální účinnost, inhibiční zóna, rezistence, přírodní látky

ABSTRACT

This thesis focuses on antimicrobial effects of natural substances commonly used in most households.

Essential natural substances, their antimicrobial effects and examples of plants containing these substances are described in the theoretical part of the thesis. Moreover, the agar diffusion method and basic information about the growth medium used during the testing are mentioned.

In the practical part, individual phases of the experiment are described in detail, including evaluation on the success rate of the two methods suggested for application of the natural substances. In the conclusion of the practical part, there are methodical recommendations for the suggested experiment.

KEYWORDS

agar diffusion test, antimicrobial efficacy, zone of inhibition, resistance, natural product

Obsah

1	Úvod	8
2	Přírodních látky a jejich léčivé účinky	9
3	Antimikrobiální účinnost přírodních látek	11
3.1	Přehled účinných přírodních látek	11
3.1.1	Alkaloidy	12
3.1.2	Fenoly a polyfenoly	12
3.1.3	Flavonoidy	13
3.1.4	Fytoncidy	13
3.1.5	Fytosteroly	14
3.1.6	Glykosidy	14
3.1.7	Hořčiny	15
3.1.8	Chinony	16
3.1.9	Kumariny	16
3.1.10	Pryskyřice	16
3.1.11	Terpeny	16
3.1.12	Třísloviny	17
3.1.13	Saponiny	17
3.1.14	Silice	17
3.1.15	Slizy	19
4	Kultivační médium	20
4.1	Druhy kultivačních médií	20
4.1.1	Základní kultivační půda	21
4.1.2	Půda ke stanovení účinnosti látek	21
5	Agarová difuzní metoda	23

6	Testování antimikrobiální účinnosti vybraných přírodních látek.....	24
6.1	Kultivace mikroorganismů.....	27
6.1.1	Vyhodnocení.....	28
6.2	Izolace čisté kultury	31
6.2.1	Vyhodnocení.....	31
6.3	Plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami a aplikace vybraných přírodních látek.....	33
6.3.1	Plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami.....	34
6.3.2	Aplikace vybraných přírodních látek	35
6.3.3	Výsledky.....	37
7	Diskuze	48
8	Metodická doporučení k jednotlivým fázím pokusu	50
8.1	I. fáze pokusu	52
8.2	II. fáze pokusu.....	53
8.3	III. fáze pokusu	54
8.4	Vyhodnocení pokusu	56
9	Závěr.....	58
10	Zdroje.....	59
10.1	Seznam použité literatury.....	59
10.2	Seznam internetových zdrojů	60
11	Seznam obrázků.....	61
12	Seznam příloh.....	65

1 Úvod

Stále se zvyšující rezistence mikroorganismů na léčiva a desinfekční činidla je jedním z hlavního důvodu, proč v posledních letech narůstá zájem lidí o preparáty přírodního původu. Jejich příznivé účinky byly v minulosti zapsány do mnoha spisů, které se dochovaly do dnešní doby. Mimo tyto spisy si nejrůznější informace o příznivých účincích daných rostlin a přírodních látek předávají lidé dodnes mezi sebou.

Dalšími z důvodů jsou stále se zvyšující možnosti snadného vyhledání a sdílení informací, environmentální výchova, nauka o zdraví a zdravém životním stylu a ekologická osvěta. Roste zájem vzdělaných lidí o návrat k využívání přírodních produktů, které méně zatěžují jak vlastní organismus tak okolní prostředí.

Přírodní látky jsou metabolity vzniklé chemickou reakcí živočišného nebo rostlinného původu. Ať už se jedná o primární či sekundární produkty chemických reakcí, v mnoha případech lze najít užitečný způsob jejich využití – jako vzorový příklad lze uvést kyslík co by odpadní produkt fotosyntézy, zároveň též látka potřebná k životu každého z nás.

Antimikrobiální účinky přírodních látek byly v minulosti mnohokrát prokázány. Některé výtažky rostlin, které byly užívány k léčbě nemocí, přetrvaly a my dodnes nenalezli účinnější léčivo. Marcus Tullius Cicero jednou řekl: „*To, co vytvořila příroda, je vždycky lepší než to, co bylo vytvořeno uměle.*“

Cílem této práce je ověřit proveditelnost navrženého mikrobiologického cvičení ve školních podmínkách. Vyzkoušet účinnost dvou metod aplikace přírodních látek a pozorovat intenzitu účinků antimikrobiálních látek na vybrané mikroorganismy.

2 Přírodních látky a jejich léčivé účinky

Léčivé účinky přírodních látek jsou známy již několik tisíciletí. Před příchodem moderní medicíny a širokého spektra léků se lidé obraceli na přírodní látky a léčebné účinky s nimi spojené. Nejstarší doklady léčebných metod s použitím rostlin nalezneme v Asii z období před 4000 lety (Korbelář, 1990).

Existuje celá řada spisů o tom, jakým způsobem lze využít rostliny například pro jejich protizánětlivé účinky, schopnost snížit tělesnou teplotu a zmírnit bolest. Uvést si můžeme příklad z Číny, kde se dodnes užívají výtažky kořene čang-sán ke snížení horečky. Historicky známé je též opium využívané již ve starém Egyptě hlavně na zmírnění tělesné a duševní bolesti, kůru chinovníku zase v minulosti užívali jihoameričtí indiáni k léčbě zimnice (Korbelář, 1990; Wenzel, 2014).

Prvními systematickými spisy rostlin se zabýval Hippokrates a Aristoteles a to již 500 let př. n. l. v Římě. V 1. stol. př. n. l. byl sepsán první rostlinný přehled pro medicínu zvaný *De Materia Medica*. Tento a jemu podobné spisy se tak později staly důležitými prameny pro moderní medicínské lékopisy (Korbelář, 1990; Stockwell, 1988). Informace o účincích přírodních látek se díky těmto spisům předávají z generace na generaci.

I v dnešní době, kdy existuje široké spektrum druhů léků, se lidé obracejí na látky přírodního původu – jedním z důvodů jsou zmiňované antimikrobiální účinky (Cowan, 1999; Wenzel, 2014). Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) využívá rostlin nebo jiných přírodních látek pro léčbu samotnou či jen podpůrnou přibližně 80 % populace (Foster, 2005). Na našem území se k léčebným účelům využívá okolo dvou set druhů rostlin (Korbelář, 1990).

V posledních letech zájem o léčbu přírodními látkami narůstá stále více v celém světě. Jedním z důvodů je narůstající rezistence mikroorganismů na stále se rozrůstající množství antimikrobiálních látek. Tento jev se tak stává celosvětovým problémem a jedním z možných řešení je hledání dalších bioaktivních látek s antimikrobiálními účinky, které by se daly využít k léčbě mikrobiální nákazy nebo alespoň jako doplňující léčba k dalším léčivům (Vinsová, 2004; Olowosulu, 2006). Jednou z podstatných výhod využití přírodních látek jako léčiv je, že jejich většinou sekundární metabolity mívají často jen nepatrné vedlejší účinky. (Korbelář, 1990).

Staré lidové zkušenosti o léčivé moci rostlin případně dalších přírodních látek sesbírané léčiteli a vzdělanci dob tehdejších jsou pro nás proto stále významnými prameny.

3 Antimikrobiální účinnost přírodních látek

Antimikrobiální látky, též zvaná antiinfektiva, jsou léčivé látky užívané k ochraně organismu neboli profylaxi před různými nemocemi nebo k následné léčbě infekčního onemocnění. V dnešní době můžeme do skupiny antiinfektiv zařadit všechny druhy antibiotik, antivirotik, chemoterapeutik, antimykotik, antiparazitik a dalších druhů léčiv. Původně, před nástupem moderních technologií a umělé syntézy léků, to byly látky přírodního původu. Příkladem je již jednou zmiňovaná kůra chinovníku (*Cinchona calysaya*), jejíž obsahová látka chinin je dodnes extrahována a využívána k úspěšné léčbě malárie (Votava, 2005).

Účinnost antimikrobiálních látek je dvojího typu. V prvním případě jsou účinky vybrané látky baktericidní – jsou pro mikrobiální buňku smrtící. Takové přírodní látky mají poměrně rychlou dobu účinku, obvykle do 48 hodin. Jsou často voleny jako léčebné přípravky u klinicky závažných stavů nebo jestliže obranyschopnost jedince je příliš nízká. V případě druhém jsou účinky vybrané látky pouze inhibiční neboli bakteriostatické. Účinnost látek na mikrobiální kulturu je selektivně toxická, tedy zastavuje nebo alespoň zpomaluje růst mikrobiální kultury. Zároveň výrazně neovlivňuje jiné funkce hostitele/hostitelské buňky. Látky takové povahy nezatěžují organismus, jejich dostupnost a množství jsou ale náročnější na získání (Votava, 2005).

Důležitým ukazatelem kvality antimikrobiálních látek je spektrum účinnosti. Zde rozdělujeme látky do dvou skupin. První skupinou jsou látky účinné na úzký okruh mikrobiálních druhů – mají úzké spektrum účinnosti. Druhou skupinou jsou naopak látky, které mají široké spektrum účinnosti, tedy jsou účinné na široký okruh mikroorganismů (Votava, 2005).

3.1 Přehled účinných přírodních látek

Účinné látky jsou dvojího typu – hlavní a vedlejší. Hlavní účinné látky jsou biologicky aktivní látky, které mají vlastnost hlavního nositele účinku. Vedlejší látky nemusí tvořit účinný komplex s hlavní látkou. Často ale doplňují účinnost hlavní látky a příznivě dopomáhají v léčbě organismu. Extrakcí a správnou kombinací vznikají směsi léčivého

charakteru s vysokou účinností a nízkým rizikem nežádoucích vedlejších účinků (Korbelář, 1990).

Mezi účinné látky přírodního původu lze zařadit také minerální látky, sacharidy a vitamíny. Tyto skupiny látek jsou nedílnou součástí biochemických procesů jak v roli prekurzorů, tak jako látky výchozí. Vitamíny jsou nedílnou součástí lidského organismu, podílejí se na mnoha chemických reakcích v těle a jsou nezbytně nutné k syntéze dalších látek těla potřebných. Mnoho druhů vitaminů si tělo neumí vyrobit samo a je třeba je získávat z potravy velmi často rostlinného původu. Celá řada sacharidů je přírodního původu a živočišné společenství včetně člověka je na těchto látkách životně závislé. Jedná se o energeticky důležité sloučeniny, látky zásobní a účinné stavební látky živého organismu. Neopomenutelnou skupinou jsou minerální látky, které hrají důležitou roli pro tvorbu a růst tkání, účastní se mnoha biochemických procesů a nervový systém by bez jejich účasti nebyl tak účinný (Marádová, 2007).

3.1.1 Alkaloidy

Tyto slabě zásadité organické sloučeniny dusíkaté povahy se většinou vyskytují ve formě pevné krystalické látky bez barvy a zápachu. Jako soli se v rostlinách vážou nejčastěji na organické kyseliny, příkladem na kyselinu šťavelovou, jablečnou, mléčnou, vinnou a další. Alkaloidy jsou známé svými silnými toxickými a farmakologickými účinky. Rostlina většinou obsahuje více než jeden druh. Hlavním účinným alkaloidem bývá zpravidla ten, jehož obsah je v rostlině nejvyšší. V malých dávkách se často jedná o významné léčivo, ve vyšších dávkách většinou bývá pro organismus toxický. Známým příkladem je morfin, který se v čisté formě poprvé podařilo izolovat z máku setého (*Papaver somniferum*) v 19. století (Cowan, 1999; [1]). Dalším příkladem rostlin obsahující alkaloidy využívané k léčbě jsou kostival lékařský (*Symphytum officinale*), pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale*), podběl lékařský (*Tussilago farfara*).

3.1.2 Fenoly a polyfenoly

Jedná se o jednoduché bioaktivní látky, některé s bakteriocidními účinky. Mezi nejznámější zástupce fenolů se řadí kyselina salicylová, jejíž využití dnes nalezneme jako analgetikum v lékařství. Dalším druhem fenolu užívaného v lékařství je propofol, který se užívá jako krátkodobé nitrožilní anestetikum. Rod mateřídouška (*Thymus*) nebo pelyněk estragon

(*Artemisia dracunculus*) obsahují kyselinu kávovou a skořicovou, které vykazují vysoké antimikrobiální účinky (Cowan, 1999).

3.1.3 Flavonoidy

Tato skupina látek je často označovaná jako bioflavonoidy díky všeobecně prospěšnému působení na organismus. Jedná se o barviva dobře rozpustná ve vodě, která tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin přírodních látek s antimikrobiálními a antioxidačními účinky. Ze skupiny flavonoidů je díky svým příznivým antimikrobiálním účinkům na trávicí trakt známý rutin, obsažen například v květu bezu černého (*Sambucus nigra*). [1] Mezi flavonoidy lze zařadit také katechiny, které jsou obsahovými složkami všech druhů zeleného čaje a jsou známé bakteriostatickými účinky na mikrobiální kultury (Cowan, 1999). Mezi další rostliny užívané pro vysoký obsah flavonoidů k léčbě patří bříza bělokorá (*Betula pendula*), divizna velkokvětá (*Verbascum densiflorum*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), hluchavka bílá (*Lamium album*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*), máta kadeřavá (*Mentha spicata*), měsíček lékařský (*Calendula officinalis*), třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*).

3.1.4 Fytoncidy

Jedná se o nejednotnou skupinu obsahových látek vyšších rostlin výraznou svými antimikrobiálními účinky. Přírodní antibiotika jsou synonymem často používaným v souvislosti s fytoncidy. Bývají součástí esenciálních olejů rostlin (silic) a jsou velmi často obsažené v některých druzích koření. Velmi známou účinnou látkou je allicin, obsažený v česneku kuchyňském (*Allium sativum*) a cibuli kuchyňské (*Allium cepa*) s výraznými antimikrobiálními účinky. Další v řadě jsou karvakrol a thymol, vysoce účinné obsahové látky tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*), v minulosti známého ve Francii jako penicilin chudých (Kybal, 1988). Dobře známý je také vanilin obsažený ve vanilkových luscích nebo eugenol jako jedna ze složek hřebíčkové silice či součást plodu citronovníku (*Citrus limon*) linalol (Bühning, 2010). Dalšími významnými zdroji fytoncidů jsou bez černý (*Sambucus nigra*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), lípa malolistá i velkolistá (*Tilia cordata et Tilia platyphyllos*), máta peprná (*Mentha piperita*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*),

měsíček lékařský (*Calendula officinalis*), podběl lékařský (*Tussilago farfara*), třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*).

3.1.5 Fytosteroly

Rostlinné steroly, jak se někdy fytosteroly označují, jsou organické látky steroidní povahy. Svojí strukturou jsou podobné cholesterolu a zároveň jsou aktivními látkami při redukci jeho hladiny v krvi. Vyšší obsah fytosterolů je proto doporučován zařadit do denní stravy (Marádová, 2007; [1]). Vyskytují se ve většině rostlinných olejů a semen, konkrétně oleje z plodů mandloně obecné (*Prunus dulcis*), kukuřice seté (*Zea mays*), aj.

3.1.6 Glykosidy

Další skupinou důležitých přírodních organických sloučenin využívaných v lékařství jsou glykosidy. Ty se skládají ze dvou základních složek – cukerné a necukerné. Jsou to látky nejčastěji bezbarvé, rozpustné v alkoholu i vodě. Většinou je nalezneme coby obsahovou složku rostlin, syntetizovat některé glykosidy umí též živočichové a mikroorganismy. Jsou důležitým faktorem při detoxikaci nerozpustných látek probíhající ve vodním prostředí a podle vlastností se dělí do několika skupin ((Moravcová, 2003; [1])).

Kardioaktivní glykosidy

Zvané také srdeční, se používají k prevenci a léčbě srdečních onemocnění. Jejich účinky ovlivňují rytmus a stažení srdeční svaloviny. Vysoká účinnost glykosidů je zajištěna podstatně malou dávkou. Dnes se využívají jen ve formě uměle vyráběných léčiv. Z důvodu vysoké toxicity nelze některé glykosidy pro farmaceutické účely využívat – příkladem známá konvalinka vonná (*Convallaria majalis*) nebo zástupci rodu náprstník (*Digitalis*) (Bühning, 2010; [1]).

Antokyanové glykosidy

Též zvané kyanogenní, jsou přírodní barviva, obsažená v rostlinách v malých koncentracích a jsou příčinou jejich zabarvení v barevném spektru červené, fialové a modré v závislosti na hladině pH. Jako příklad lze uvést brusnici brusinku (*Vaccinium vitis-idaea*), rybíz černý (*Ribes nigrum*) nebo plody šípku (Bühning, 2010).

Antrachinonové glykosidy

Jde o látky s projímavými účinky obsažené v rostlinách. Nadměrným užíváním této skupiny glykosidů může dojít k intoxikaci organismu, důsledky ale nebývají závažné. Významným zástupcem antrachinonových glykosidů je aloin, obsažený v listech aloe pravé (*Aloe vera*). Dalšími známými glykosidy této skupiny jsou glukofrangulin vyskytující se v kůře krušiny olšové (*Rhamnus frangula*) nebo hypericin, který je obsahovou látkou natě třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) (Bühning, 2010; [1]).

Hořčičné glykosidy

Zvané též glukosinoláty nebo thioglykosidy jsou látky ostré chuti a palčivé vůně. Při kontaktu s pokožkou vyvolávají podráždění, zarudnutí a zvýšený pocit tepla. Hořčičné glykosidy podporují prokrvení pokožky a jsou využívány pro silné antimikrobiální účinky jako součást některých širokospektrých antibiotik. Významnými zástupci rostlin s obsahovými složkami hořčičných glykosidů jsou např. brukev černá (*Brassica nigra*), hořčice setá (*Sinapis alba*), křen selský (*Armoracia rusticana*), nebo řepka olejka (*Brassica napus*). U všech zmíněných rostlin se glykosidy v největší míře vyskytují v kořenech a semenech (Bühning, 2010).

3.1.7 Hořčiny

V medicíně se tato skupina biochemických látek hořké chuti uplatňuje jako podpůrný prostředek pro zvýšení činnosti trávicího traktu. Výrazně působí na vylučování žaludečních šťáv a tím napomáhají aktivnímu procesu trávení. Hořkou chutí dráždí chuťové receptory, čímž zajišťují zvýšenou chuť k jídlu. V jiných případech se hořčiny využívají jako gastrosedativa v podobě tinktur, jejichž schopností je zmírnit nežádoucí žaludeční aktivity. Společně s dalšími bioaktivními látkami hrají důležitou roli při vstřebávání vitamínu B12 a železa čímž podporují krvetvorbu (Bühning, 2010; [1]). Mezi nejznámější zástupce se řadí absinthin a artabsin, které jsou obsahovými složkami pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*). Dalšími rostlinami obsahující hořčinné látky využívanými k léčbě jsou andělíka lékařská (*Angelica archangelica*), chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*), zeměžluč okolíkátá (*Centaurium erythraea*), pampeliška lékařská (*Taraxacum officinale*) (Opletal, 2007).

3.1.8 Chinony

Jedná se o významnou skupinu přírodních barviv. Zároveň jsou to aromatické sloučeniny s vysokou reaktivitou. V mikrobiální buňce jsou schopny inaktivovat některé druhy proteinů a přerušit jejich funkci (Cowan 1999; Moravcová, 2003).

3.1.9 Kumariny

Tyto aromatické sloučeniny krystalické struktury bývají častou součástí pryskyřic. Aromatické účinky kumarinů jsou využitelné pro odpuzení hmyzu a jsou typické nasládlou vůní sena. Pro vysokou míru toxicity nejsou vhodné pro časté užívání. Kumariny se rozdělují do dvou základních skupin – jednoduché kumariny a kondenzované, kde největší zastoupení mají furanokumariny. Příkladem rostliny s vysokým obsahem furanokumarinů je bolševník obecný (*Heracleum sphondylium*), jehož účinky mohou být pro člověka smrtelné (Moravcová, 2003; [1]). Příkladem rostlin s obsahem kumarinů, které se využívají k léčbě jsou andělíka lékařská (*Angelica archangelica*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*), libeček lékařský (*Levisticum officinale*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*).

3.1.10 Pryskyřice

Pryskyřice jsou kapaliny vysoké viskozity, které se při poranění rostliny, zejména kůry stromu, uvolňují na povrch a zacelují vzniklou ránu (Moravcová, 2003; [1]). Pro své dezinfekční a protizánětlivé účinky jsou využívány zejména bříza bělokorá (*Betula pendula*), chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), jalovec obecný (*Juniperus communis*), kmín kořený (*Carum carvi*), aj.

3.1.11 Terpeny

Jsou obsaženy v pryskyřicích a silicích rostlin. Společně se silicemi jsou součástí pryskyřic, jako komplex tvoří ochrannou bariéru rostliny před mikrobiální nákazou. Terpeny mají obecně schopnost potlačit růst mikroorganismů. Rostlině slouží také jako látka odpuzující býložravce (Cowan, 1999).

3.1.12 Třísloviny

Tyto biochemické látky jsou typické svou svíravou, trpkou chutí, která je známá z domácího připravovaných odvarů některých druhů bylin. U rostlin se jedná o častý koncový produkt látkové výměny. Třísloviny jsou významné svou schopností srážet bílkoviny a jejich využití pro člověka je zejména při léčbě průjmů, intoxikaci alkaloidy nebo těžkými kovy (Bühning, 2010). Mezi rostliny s obsahem tříslovin využívaných k léčbě patří brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*), kontryhel žlutozelený (*Alchemilla vulgaris*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), růže šípková (*Rosa canina*).

3.1.13 Saponiny

V některých případech se saponiny uvádí jako samostatná skupina, jinak se řadí do skupiny glykosidů. Jsou známy svými desinfekčními účinky, schopností snížit povrchové napětí vody a pěnivosti. V kontaktu s krví zapříčiňují rozklad červených krvinek. Typicky nebezpečnými rostlinami obsahujícími zdraví škodlivé saponiny jsou vraní oko čtyřlíst (*Paris quadrifolia*), nebo zástupci rodu koukol (*Agrostemma*) (Moravcová, 2003; [1]). K léčbě se pro obsah saponinů využívají rostliny břečťan popínavý (*Hedera helix*), černucha setá (*Nigella sativa*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), komonice lékařská (*Melilotus officinalis*), mydlice lékařská (*Saponaria officinalis*), pilát lékařský (*Anchusa officinalis*), prvosenka jarní (*Primula veris*), aj.

3.1.14 Silice

Tyto přírodní látky intenzivní vůně, dříve označované jako éterické oleje, tvoří převážně terpeny. Jsou součástí rostlinných pletiv, případně se koncentrují v konkrétních orgánech rostlin. Mají rozmanité pole působnosti. Nejčastěji jsou známy svou vůní, jako lákadlo opylujícího hmyzu. Mohou také plnit funkci ochrany před býložravci nebo zabránit nadměrnému vypařování vody (Moravcová, 2003).

V domácnosti jsou typickými zástupci například bedrník anýz (*Pimpinella anisum*), dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), kmín kořený (*Carum carvi*), rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), které lidé využívají jako koření. Silice lze využít i ve formě nálevů a odvarů. Pro lepší funkci trávicího traktu, upravení žaludeční činnosti nebo zlepšení chuti se využívá účinků anděliky lékařské (*Angelica archangelica*), máty peprné (*Mentha piperita*), aj. Pro zklidnění organismu jsou často

užívané levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) nebo kozlík lékařský (*Valeriana officinalis*). Mimo požívání těchto látek ve formě odvarů a nálevů, je za účelem léčby možno také bylinné výpary inhalovat (Moravcová, 2003; [1]). Antimikrobiální činnost silic je stále farmakologicky studována, účinné extrakty rostlin jsou využívány k tvorbě moderních léčiv. Mimo to se sledují antioxidantní účinky obsahových látek převážně kořenových částí rostlin (Opletal, 2005).

Příklady silic využívaných k léčbě:

- Citral – látka výrazná vůní citrusů, díky této vlastnosti využívaná v parfumerii. Má silné antimikrobiální účinky. Je součástí citrusových plodů, lze ji také nalézt například u meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) nebo levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) (Bühning, 2010; Moravcová 2003).
- Eugenol – rozpoznatelný typickou kořenitou vůní hřebíčku. Díky své vůni je velmi často využíván v potravinářském průmyslu a pro své antimikrobiální účinky v medicíně. Jedná se o obsahovou složku hřebíčkovce kořeného (*Syzygium aromaticum*) (Bühning, 2010; Moravcová 2003).
- Kafr – látka v dnešní době vyráběna synteticky, dříve získávaná ze stromu kafrovníku. Má mírné antiseptické a anestetické účinky, podobné jako mentol. Vysoký obsah kafru lze nalézt v listech rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) nebo šalvěji lékařské (*Salvia officinalis*) (Bühning, 2010; Moravcová 2003).
- Karvakrol – látka s antimikrobiálními účinky. V medicíně se využívá mimo jiné jako inhibitor růstu bakteriální kultury *Escherichia coli*. Díky těmto účinkům se jako mikrobiální ochranná složka využívá též v potravinářství. Karvakrol je obsažen v rostlinách, příkladem jsou dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) nebo tymián obecný (*Thymus vulgaris*) (Bühning, 2010; Kybal, 1988).
- Limonen – bezbarvá kapalina výrazná vůní citrusů. Název je odvozen od plodu citronovníku (*Citrus limon*), v jehož kůře se vyskytuje vysoké množství. Je součástí všech druhů citrusů, nalezneme jej ale také například u kmínu kořeného (*Carum carvi*) (Bühning, 2010; Kybal, 1988).

- Linalol – má obdobné avšak mírnější antimikrobiální účinky než je tomu v případě thymolu. V rostlinách se vyskytuje například u druhů levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), nebo tymián obecný (*Thymus vulgaris*) (Bühning, 2010; Kybal, 1988).
- Mentol – má mírné anestetické a antimikrobiální účinky. Při kontaktu s pokožkou vyvolává pocit chladu. Jedná se o obsahovou látku rostlin rodu máta (*Mentha*), konkrétním příkladem lze uvést mátu peprnou (*Mentha piperita*) (Bühning, 2010; Moravcová 2003).
- Thymol – ve vodě rozpustná látka se silnými antiseptickými účinky. Vyskytuje se hlavně v rostlinné nati. Vysoké množství obsahuje tymián obecný (*Thymus vulgaris*), dále například mateřídouška úzkolistá (*Thymus serpyllum*) nebo dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) (Bühning, 2010; Kybal, 1988).

3.1.15 Slizy

Jedná se o látky viskózní konzistence, které většinou plní roli ochranné vrstvy. Jejich využití lze nalézt v léčbě zánětlivých onemocnění. Hojný výskyt slizů nalezneme v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*), česneku kuchyňském (*Allium sativum*) nebo u zástupců sukulentních rostlin, příkladem aloe pravé (*Aloe vera*) (Stumpf, 2013).

4 Kultivační médium

Pěstování mikroorganismů provádíme *in vitro* – v přeneseném slova smyslu to znamená v laboratorních podmínkách – v této práci konkrétně na Petriho miskách. Proces kultivace mikroorganismů probíhá na tzv. kultivačních půdách - kultivačních nebo také živých médiích (Votava, 2005).

Při práci s kultivačním médiem je třeba mít vždy na paměti dodržení podmínek pro přípravu a manipulaci s kultivačními půdami. Aby bylo kultivační médium účinné, je zapotřebí dostatek vody, živin, zdrojů energie, optimální teplota, pH, vhodný osmotický tlak. Dále je důležité dodržet podmínky pro zajištění sterility prostředí a ochranu před kontaminací (Votava, 2005).

4.1 Druhy kultivačních médií

Kultivační půdy můžeme rozdělit do různých skupin podle konzistence, složení nebo účelu. Jedním ze základních dělení je rozdělení na přirozené (komplexní) a syntetické živné médium. Základem přirozeného kultivačního média je živný bujón (universální tekutá půda), který není chemicky definován. Naproti tomu u syntetického živného média lze přesně definovat chemické sloučeniny, z kterých byla kultivační půda sestavena (Votava, 2005).

Rozdělením podle konzistence se živná média dělí do dvou skupin – tekutá a pevná. Tekuté kultivační médium může obsahovat rozmanité druhy bujónů. Mimo to může obsahovat tzv. cukrové půdy založené na peptonové vodě. Tyto kultivační půdy jsou vhodné pro snadný přístup vody a živin, díky čemuž mikroby snáze vyrůstají i ze starého nebo malého množství inokula -očkované suspenze mikroorganismů. Nevýhodou tekutého kultivačního média je, že kultivace mikroorganismů se většinou projeví jen zakalením živného média, zcela výjimečně ve formě sedimentu u dna nebo blankou při hladině média (Votava, 2005).

Pevná kultivační půda je oproti tekuté vhodnější alternativou pro možnost pěstování mikrobů v podobě izolovaných kolonií. Vybraný vzorek mikroorganismů lze jednoduše naočkovat vatovou tyčinkou na pevné živné médium a po pár dnech (maximálně do týdne) pozorovat kultivované mikrobiální kolonie. Pro získání čisté kultury je třeba opakovaně přenést vzorek vybraných mikroorganismů pomocí mikrobiologické kličky. Pevná kultivační půda je ve svém základu ztužena za pomoci agaru (Votava, 2010).

Podle účelu a složení jsou v případě této práce důležité dva druhy pevných kultivačních půd – základní půda a půda k antibiotickým zkouškám a ke stanovení účinnosti látek (čistá a obohacená glukózou).

4.1.1 Základní kultivační půda

Základní kultivační půda se využívá pro izolaci mikrobiologického vzorku, kultivaci mikroorganismů a případné přeočkování čisté mikrobiální kultury. Tento typ kultivační půdy je zejména vhodný pro kultivaci běžně se vyskytujících mikroorganismů nenáročných na živiny (Votava, 2005).

Jako základní druh kultivační půdy je velmi často používán živný (masopeptonový) agar. Obsahovými složkami tohoto média jsou tekutý bujón, peptonová voda a pevný živný agar. Tekutý bujón je prvně obohacen o masový extrakt, pepton a chlorid sodný (NaCl). Masový základ je živný základ, který je na živiny poměrně chudý. Pepton je produkt enzymatického (peptického) natrávení masa, který v sobě obsahuje peptidy a volné aminokyseliny. U připraveného bujónu je třeba udržovat pH v rozmezí 7,2 až 7,4. Živný (masopeptonový) agar pak lze připravit rozvařením obvykle 1,5 % suché agarové řasy v bujónu. Nejčastějšími rody mořských řas využívaných pro extrakci agaru (směs polysacharidů agarózy a agaropektinu) jsou rody rudých mořských řas *Gelidium* a *Gracilaria*. Agar se rozpouští asi při 90 °C za vysoké spotřeby vody a tuhne při teplotě kolem 35 °C až 40 °C. Připravenou živnou půdu je zapotřebí nechat projít sterilizačním procesem při 121 °C alespoň 20 minut (Pavlasová, 2011; Votava, 2005).

4.1.2 Půda ke stanovení účinnosti látek

Pro stanovení účinnosti látek je dobré zvolit půdu s Mueller-Hintonové agarem (MH agar). Jedná se o agar, který je obvykle využíván k antibiotickým zkouškám a ke stanovení účinnosti látek nenáročných mikroorganismů, jelikož zajišťuje lepší difuzi vybraných látek (Votava, 2005.). Mueller-Hintonové agar v čisté formě se využívá pro stanovení účinnosti látek na bakteriální kulturu. Pokud jsou testovány účinky látek na kvasinky nebo plísňe, obohacuje se Mueller-Hintonové agar o glukózu, případně maltózu, jelikož na čistých půdách neprobíhá kultivace tak dobře (Votava, 2005). Obsahovými složkami MH agaru jsou pepton, kaseinový hydrolyzát, Ca^{2+} , Mg^{2+} a agar. MH agarovou směs lze opatřit ve formě prášku, smícháním s destilovanou vodou a zahřátím pak vznikne po rozpuštění látek pevné

kultivační médium. Připravenou půdu je třeba sterilizovat v autoklávu při teplotě 120 °C alespoň 15 minut. [2]

5 Agarová difuzní metoda

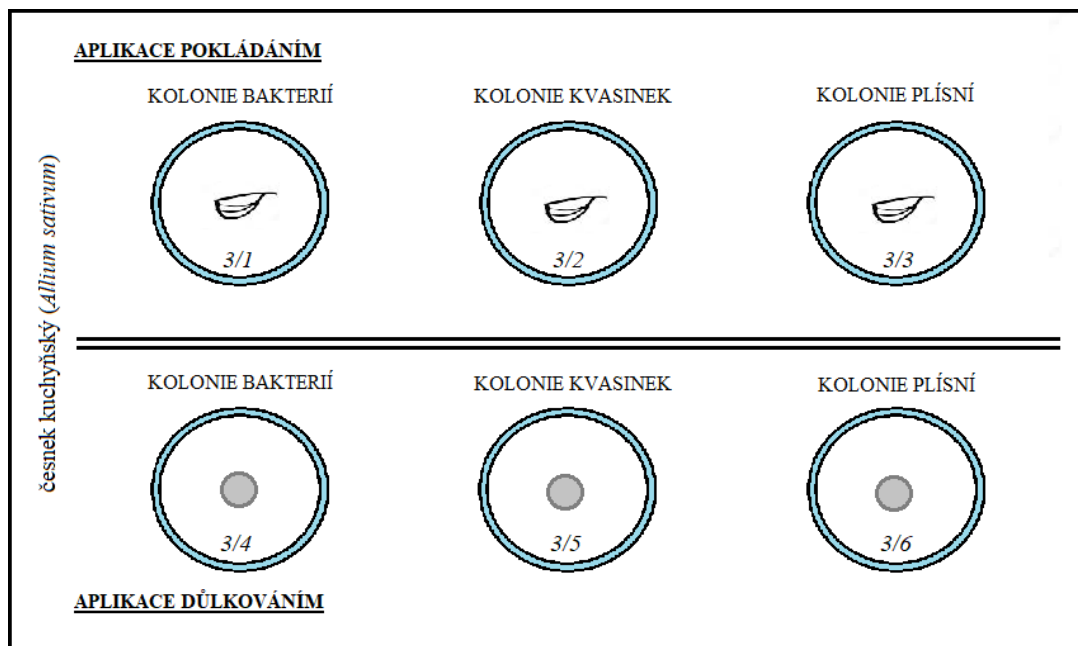
Citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám lze testovat kvalitativní metodou agarové difuze. Antimikrobiální účinky sledujeme na pevných půdách s Mueller-Hintonové agarem plošně naočkovanými vybranými druhy mikroorganismů. Jednotlivé druhy mikroorganismů jsou citlivé na vybrané vzorky antimikrobiálních látek. Citlivost lze pozorovat v okolí vzorku, kde se nachází zóna zábrany růstu (tzv. inhibiční zóna). Velikost průměru této zóny určuje síla antimikrobiální účinnosti. Čím vyšší je citlivost mikrobiální kultury na vybranou antimikrobiální látku, tím větší je průměr inhibiční zóny. V případě nulové viditelnosti inhibiční zóny lze pozorovat rezistentní reakci mikrobiální kultury (Votava, 2010).

6 Testování antimikrobiální účinnosti vybraných přírodních látek

V praktické části této práce jsem agarovou difuzní metodou ověřoval antimikrobiální účinky mnou vybraných přírodních látek na vybrané mikroorganismy. Veškerý průběh práce byl uzpůsoben podmínkám školního prostředí – nejedná se o prostředí aseptické, to ovšem nijak viditelným způsobem neovlivnilo průběh mého testování.

Celý průběh testování jsem rozvrhl do čtyř týdnů, abych docílil dostatečného rozestupu mezi jednotlivými fázemi. Mezi každou fází – kultivací mikroorganismů, izolací čisté kultury, plošným naočkováním Petriho misek čistými kulturami a aplikací vybraných přírodních látek – jsem zvolil rozestup jednoho týdne z toho důvodu, abych předešel problémům chybné kontaminace živného média, případně méně příznivým podmínkám kultivace mikroorganismů. V případě bezchybné kontaminace a dostatečně vhodných podmínek pro kultivaci jsem pro potřebu zpomalení růstu jednotlivých kolonií umístil naočkované Petriho misky do chladnějšího prostředí – laboratorní lednice.

Pro testování antimikrobiálních účinků přírodních látek jsem zvolil dvě metody aplikace přírodních látek na plošně naočkované Petriho misky čistými kulturami: aplikace pokládáním a aplikace důlkováním (viz obr. 1).



Obr. 1 - Vybrané dva způsoby aplikace přírodních látek na plošně naočkované Petriho misky čistými kulturami (vlastní tvorba, 2017).

Při první metodě byly vybrané přírodní látky nakrájeny na menší úhledné části, které byly následně pokládány na plošně naočkované Petriho misky čistými kulturami. Tuto metodu jsem se rozhodl použít z důvodu praktického, jednoduchého provedení a hlavně estetického vzhledu. Jak je možné pozorovat na fotografiích ve třetí fázi testování (viz obr. 15 – 18), vybrané přírodní látky jsou snadno rozeznatelné i na fotografiích pouhým okem a celá dokumentace pokusu působí názornějším dojmem. Z fotografií ve čtvrté fázi testování (viz obr. 20 – 27) je ovšem patrné, že tato metoda nebyla příliš účinná a její výsledky nám skoro nic nevypovídají o antimikrobiálních účincích vybraných přírodních látek. Konkrétními příčinami neúspěchu testování touto metodou se podrobněji zabývám v celkovém vyhodnocení průběhu práce. Při druhé metodě jsem aplikoval přírodní látky v rozmělněné formě (viz obr. 19). Přírodní látky jsem nakrájel na menší kousky, které jsem následně v třetí misce s tloučkem rozmělnil na kašovitou formu. Tu jsem poté aplikoval do připravených důlků na plošně naočkovaných Petriho miskách čistými kulturami. Zvolením této metody jsem chtěl zajistit vyšší účinnost uvolnění antimikrobiálních látek, zároveň také větší pravděpodobnost úspěšnosti testování.

Testování antimikrobiálních účinků jsem prováděl na třech skupinách mikroorganismů – bakteriích, plísňích (vláknitých houbách) a kvasinkách. Všechny tři skupiny mikroorganismů jsem se pokusil izolovat v první týdně a následně jsem sledoval jejich růst. V druhém týdně jsem pak již z vypěstovaných kolonií izoloval čisté kultury a dále sledoval jejich růst. Abych měl stoprocentní jistotu zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů v průběhu dalších částí testování, z izolovaných kultur jsem nakonec využil pouze jednu vybranou bakteriální kolonii. Kolonii kvasinek jsem odebral z připraveného vzorku droždí. Pro lepší názornost antimikrobiálních účinků přírodních látek na kolonii plísni jsem použil vzorek ušlechtilé bílé potravinářské plísně z povrchu sýra typu Hermelín.

Přírodní látky, které jsem použil při testování antimikrobiálních účinků, jsem vybíral dle několika kritérií. V první řadě mě zajímala dostupnost jednotlivých druhů a všeobecná informovanost o jejich léčebných účincích. Jelikož předpokládám pozdější využitelnost metodiky tohoto testování ve výuce na druhém stupni základní školy, popřípadě u žáků středních škol, nemělo by význam vybírat příliš neznámé druhy, které si žák bez názorné ukázky těžko vybaví. O vlastnostech a využití přírodních látek je více v podkapitole 2.1

Přehled účinných přírodních látek. Dále mě zajímaly zkušenosti z testování a účinnost konkrétních obsahových látek, které jsem čerpal z jiných prací, zmíněných v kapitole 7 Metodická doporučení k jednotlivým fázím pokusu.

Mnou vybraných a testovaných přírodních látek bylo osm – aloe pravá (*Aloe vera*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*), zázvor lékařský (*Zingiber officinale*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*), cibule kuchyňská (*Allium cepa*), paprika setá (*Capsicum annuum*), plod citronovníku (*Citrus limon*) a včelí med.

Rostlinu aloe pravou (*Aloe vera*) jsem vybral z důvodu všeobecně známých léčivých účinků s ní spojených. Extrakt této sukulenní rostliny se využívá jako doplněk stravy pro účinnou ochranu před mikrobiálními nákazami. Pro vysoký obsah slizů se využívá při hojení ran a popálenin. S využitím pozitivních účinků této rostliny se bohužel v dnešní době setkáváme ale více v alternativní medicíně. Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) je bylina známá svou pronikavou vůní, jejíž výskyt je obvyklý ve většině domácností. Jedná se o jednu z nejsilněji působících rostlin, díky vysokému množství účinných látek jakou jsou flavonoidy, hořčiny, třísloviny, silice, aj. Fytoncidní obsahové látky thymol, karvakrol a linalol jsou průmyslově a farmaceuticky využívány. Zázvor lékařský (*Zingiber officinale*) je další rostlinou vyskytující se často jako koření v domácnosti. Z oddenku zázvoru se připravuje odvar využívaný při nachlazení a k celkovému znovunabytí obranyschopnosti organismu. Česnek kuchyňský (*Allium sativum*) je celosvětově známý druh koření. Příčinou typického aroma česneku je silice zvaná allicin. Je bohatý na vitaminy a minerální látky jako jsou jod, vápník nebo selen. Díky vyššímu množství obsahových složek flavonoidů, saponinů a slizů se jedná o rostlinu s výrazně účinnými antimikrobiálními účinky užívanou v lidovém léčitelství. Podobným složením účinných přírodních látek je cibule kuchyňská (*Allium cepa*), také využívána coby přírodní léčivo. Hojné uplatnění této rostliny nalezneme v domácnosti, kde se jako zelenina nebo koření užívá pro přípravu mnoha pokrmů. Do skupiny testovaných látek přírodního původu jsem zařadil odrůdu papriky seté (*Capsicum annuum*) s vysokým obsahem toxinu zvaného kapsaicin. Jedná se o toxin, jehož účinky v případě kontaktu s lidskou tkání vyvolávají pocit pálení, který se zvyšuje s rostoucím obsahem toxinu v paprice. Díky této látce jsou vybrané druhy papriky seté, obsahující určité množství kapsaicinu, nazývány pálivé chilli papričky. Předposlední látkou vybranou k testování je

plod citronovníku (*Citrus limon*), který obsahuje vysoké množství účinných látek, jako jsou linalol a limonen. Jedná se o látky fytoncidního charakteru, které kromě antimikrobiálních účinků jsou také příčinou typické vůně citrusových plodů. Poslední látku přírodního původu, kterou nelze řadit mezi rostliny je včelí med. Jedná se o lepkavou kapalinu sladké chuti, typickou ve většině domácností. V lidovém léčitelství má využití medu dlouholetou tradici. Díky antiseptickým účinkům, které jsou s medem svázané, se často využívá v kombinaci s citronem nebo zázvorem jako dochucovadlo odvarů.

V následujících podkapitolách praktické části chci konkrétněji rozebrat jednotlivé postupy svého výzkumu a pomocí přiložených fotografií ukázat výsledky antimikrobiální účinnosti mnou vybraných přírodních látek, zhodnotit úspěšnost mého testování a zmínit chyby, které ovlivnily průběh testování.

6.1 Kultivace mikroorganismů

Pomůcky: Petriho misky s masopeptonovým agarem, vatové tyčinky, destilovaná voda, lihový fix

Před samotnou kontaminací Petriho misek mikroorganismy bylo zapotřebí pro lepší orientaci mezi preparáty nejprve označit jednotlivé Petriho misky s masopeptonovým agarem. Pro sebe jsem jako nejrozumnější způsob označení zvolil číselné značení (viz obr. 1) Každou Petriho misku jsem si označil dvěma čísly – číslem před lomítkem jsem označil sérii testování (v případě, který lze vidět na obrázku, se jedná o třetí sérii testování). Číslem za lomítkem jsem pak označil konkrétní Petriho misku v dané sérii – pro přesnou orientaci, o jaký vzorek se jedná a odkud byl odebrán.

Jakmile jsem si předem označil všechny připravené Petriho misky s masopeptonovým agarem, mohl jsem přejít k samotné izolaci mikroorganismů z okolního prostředí. Kolonie mikroorganismů jsem z předem vybraných míst odebíral pomocí vatových tyčinek. Pro zaručení co možná nejnižší možnosti nežádoucí kontaminace mikroorganismy z jiného prostředí, jsem pro každý stěr použil vatovou tyčinku pouze jednou. Nejprve jsem ji ponořil do destilované vody, následně provedl stěr z vybraného místa a takto kontaminovanou vatovou tyčinkou rozetřel sebraný vzorek na připravené Petriho misce s masopeptonovým agarem.

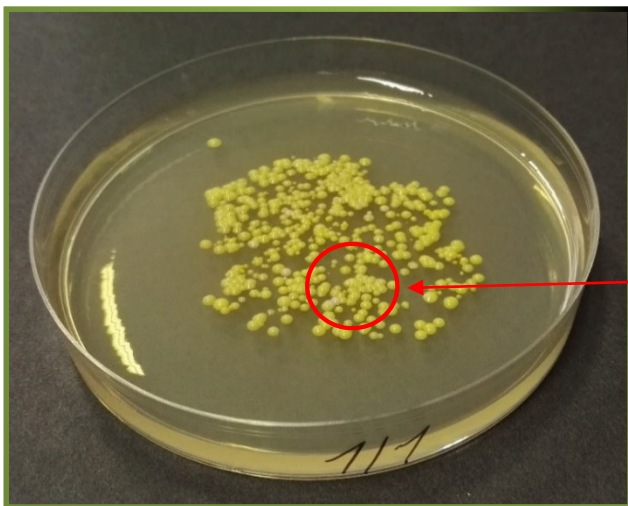
Celkem jsem si zvolil osm míst stěru s ohledem na jejich dostupnost a atraktivitu. Stěry jsem odebíral ze své dlaně, displeje mobilního telefonu, kliky od dveří, dutiny ústní, tlačítka automatu na chlazené nápoje, veřejného pítka, talíře se zbytky jídla a pracovního stolu. Talíř se zbytky jídla jsem zvolil z důvodu zvýšené pravděpodobnosti výskytu kvasinek a plísni. Ostatní místa jsem vybral hlavně proto, že se jedná o často frekventovaná místa kontaktem dalších osob proto i vysoké pravděpodobnosti výskytu mikroorganismů, s kterými se denně dostáváme do styku.

Po kontaminaci jednotlivých Petriho misek s masopeptonovým agarem jsem každou misku co nejdříve uzavřel víkem, abych předešel další nežádoucí kontaminaci živného média mikroorganismy okolního prostředí. Jakmile jsem dokončil kontaminaci poslední Petriho misky, všechny připravené preparáty uzavřené víkem jsem uskladnil do krabice dnem vzhůru a jednotlivé mikrobiální kolonie nechal růst v suchém prostředí při laboratorní teplotě. V průběhu následujících dnů pak bylo třeba kontrolovat nárůst jednotlivých kolonií mikroorganismů a v případě výsledku dostačujícího dalšímu testování jsem kontaminované Petriho misky uskladnil do chladnějšího prostředí – laboratorní lednice.

6.1.1 Vyhodnocení

Ještě před izolací čisté kultury z preparátů připravených v první fázi testování bylo zapotřebí vyhodnotit výsledky předešlé práce. Na Petriho miskách (viz obr. 2 – 7) jsou vidět tvarem i barvou různé mikrobiální kolonie. Ze samotného makroskopického pozorování agarových pūd lze vyčíst mnoho informací.

Podobné zastoupení mikroorganismů po kontaminaci stěrem z dlaně a displeje mobilního telefonu je zřejmé. Na fotografiích můžeme pozorovat oběma místům společné kolonie bakterií žlutého zbarvení (viz obr. 2 – 4). Podobné typy bakteriálních kolonií můžeme také pozorovat na fotografii mikrobiálních kolonií odebraných stěrem z veřejného pítka (viz obr. 5). V případě povedeného stěru pro kultivaci kolonie kvasinek jich je nejvíce v odebraném vzorku z pracovního stolu (viz obr. 6 – 7). Menší kolonii kvasinek ovšem můžeme pozorovat i ve stěru mobilního telefonu (viz obr. 3 – 4). Kolonie plísni se podařila kultivovat jen v jediném vzorku odebraném z pracovního stolu (viz obr. 6 – 7).



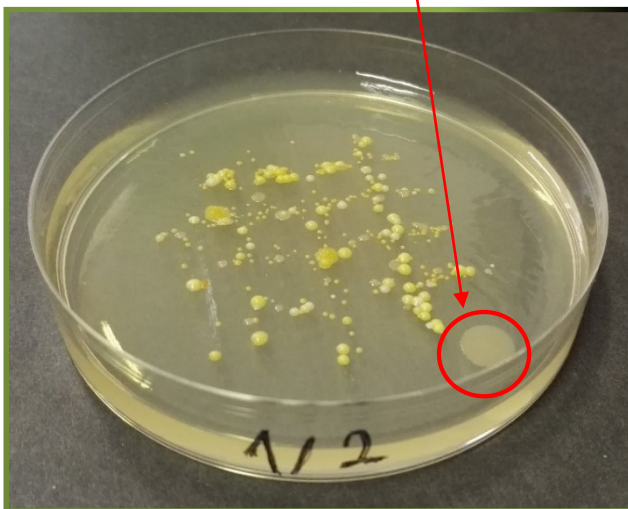
Žlutě zbarvené kolonie bakterií.

Obr. 2 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z dlaně (vlastní tvorba, 2017).

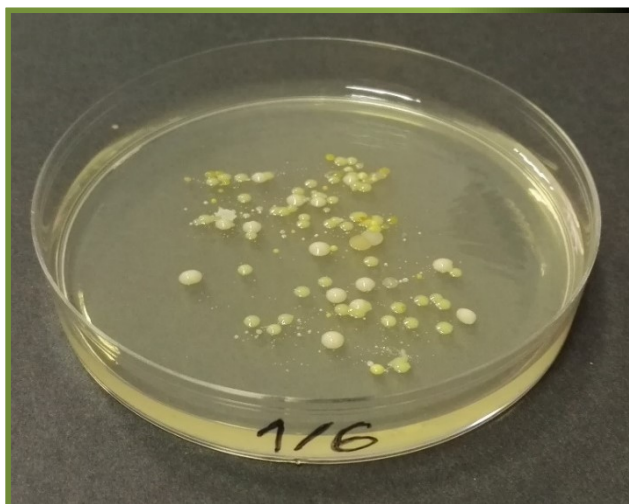
Menší kolonie kvasinek odebraná stěrem z mobilního telefonu.



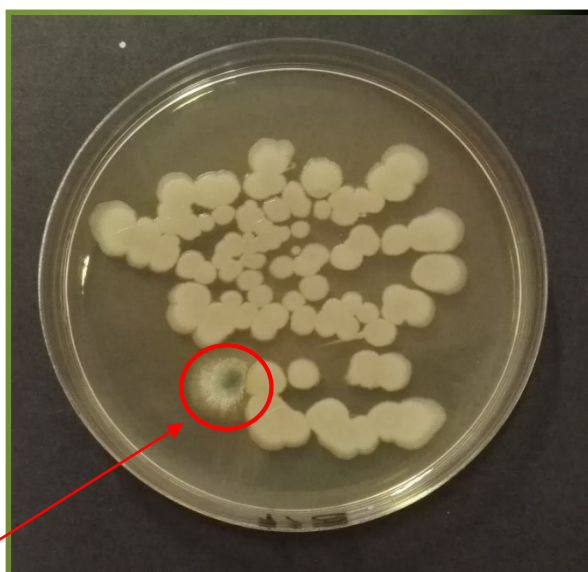
Obr. 3 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z displeje mobilního telefonu - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).



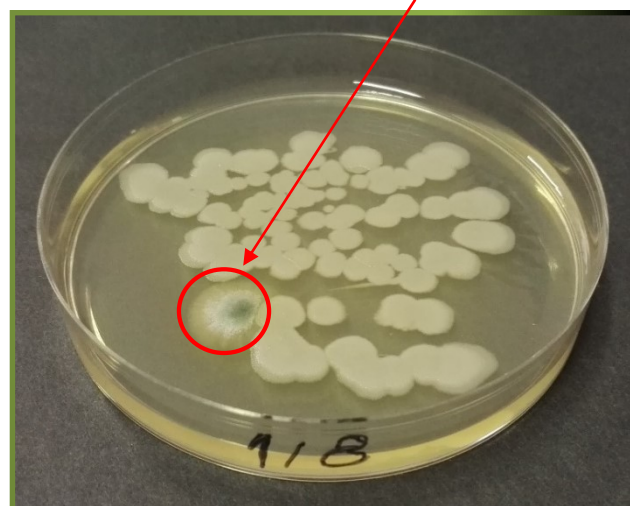
Obr. 4 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z displeje mobilního telefonu (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 5 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z veřejného pítka (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 6 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z pracovního stolu - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 7 – Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z veřejného pítka (vlastní tvorba, 2017).

Kolonie plísni odebraná stěrem z pracovního stolu.

6.2 Izolace čisté kultury

Pomůcky: Petriho misky s masopeptonovým agarem, mikrobiologické kličky (jednorázové nebo pro opakované použití), kahan, lihový fix

Materiál: mikrobiální kultury izolované z okolního prostředí

Po zhodnocení výsledku izolace kultur mikroorganismů z okolního prostředí bylo zapotřebí z vybraných vzorků izolovat čisté kultury. Před samotnou izolací mikroorganismů jsem opět číselně označil Petriho misky s masopeptonovým agarem. Následně jsem přenesl vybrané mikrobiální kultury na nově připravené živné médium.

Přenos vybraných mikrobiálních kultur jsem prováděl pomocí mikrobiologické kličky, kterou jsem použil opakovaně. Před samotným započítím práce jsem nejprve provedl sterilizaci mikrobiologické kličky nad kahanem. Jakmile rozžhavené očko mikrobiologické kličky vychladlo, nabral jsem vzorek vybrané kultury mikroorganismů, kterou jsem zvolil pro další průběh testování. Odebraný vzorek jsem rozetřel po povrchu nově připravené Petriho misky s masopeptonovým agarem a jako tomu bylo v první části izolace mikrobiálních kolonií, přikryl víkem. Pro další přenos mikrobiální kultury na čisté živné médium jsem znovu opakoval celý postup, včetně sterilizace mikrobiologické kličky.

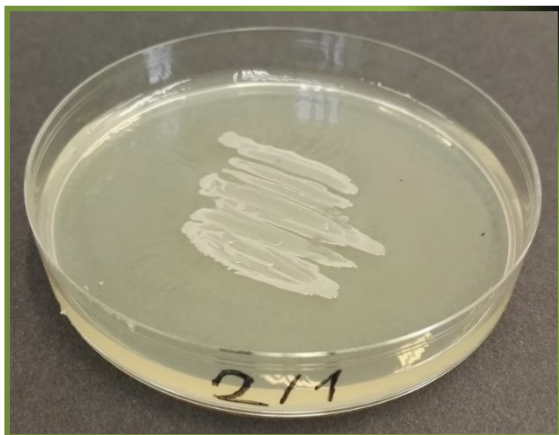
Po celý průběh mého testování bylo zapotřebí dbát pozornosti a opatrnosti při práci. Abych předešel zbytečným chybám v měření zapříčiněných případnou kontaminací mikroorganismy okolního prostředí, dbal jsem dodržování zásad práce se sterilními laboratorními pomůckami. I přesto, že se nejednalo o práci v prostředí aseptickém, jsem se snažil co nejvíce snížit riziko nežádoucího narušení práce.

Po dokončení kontaminace poslední Petriho misky, jsem opět všechny preparáty uschoval do krabice dnem vzhůru a nechal růst v suchém prostředí při laboratorní teplotě. V následujících dnech jsem pak pravidelně kontroloval růst mikrobiálních kolonií.

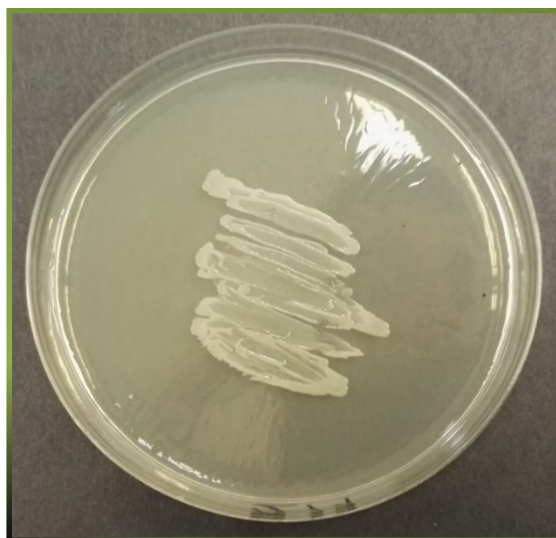
6.2.1 Vyhodnocení

Vybrané vzorky mikroorganismů, které jsem zvolil pro další průběh testování, jsem zúžil na kolonie bakteriálního původu (viz obr. 8 – 13). Bakteriální kultury jsem volil s ohledem na zajímavost místa prvotního sběru a vizuální atraktivitu jednotlivých kolonií.

Z přiložených fotografií lze rozpoznat, že se jedná o druhy, jejichž přirozený místem výskytu jsou dlaně, nebo se s dlaní dostávají často do styku (viz obr. 2 – 4). Z fotografií přiložených k této části (viz obr. 8 – 13) je vidět, že kultivace jednotlivých bakteriálních kultur se podařila bez viditelných chyb. Všechny tři vybrané kolonie bakterií se povedlo izolovat a kultivovat bez kontaminace jinými mikroorganismy, tzn., povedlo se vypěstovat čisté kultury.



Obr. 8 - Izolovaná kolonie bakterií - bílá, poloprůhledná (vlastní tvorba, 2017).



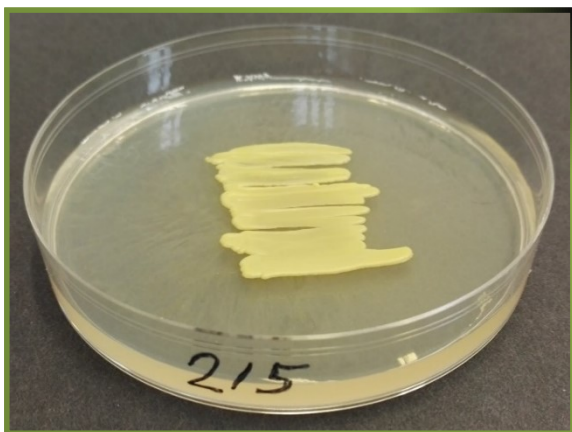
Obr. 9 - Izolovaná kolonie bakterií (bílá, poloprůhledná) - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).



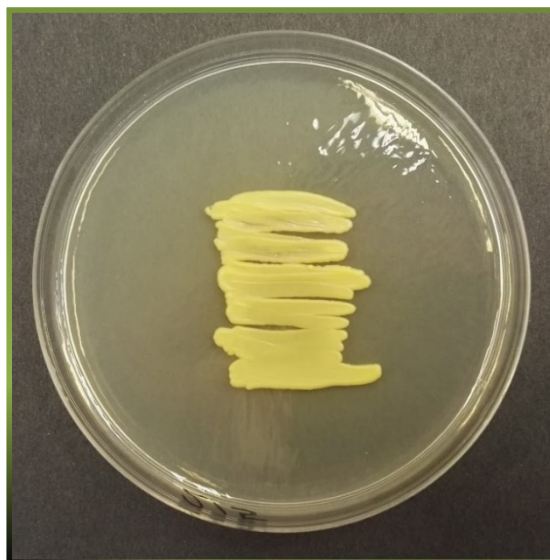
Obr. 10 - Izolovaná kolonie bakterií (bílá, neprůhledná) – pohled shora (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 11 Izolovaná kolonie bakterií - bílá, neprůhledná (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 12 - Izolovaná kolonie bakterií - žlutá, neprůhledná (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 13 - Izolovaná kolonie bakterií (žlutá, neprůhledná) – pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

6.3 Plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami a aplikace vybraných přírodních látek

Pomůcky: Petriho misky s čistým Mueller-Hintonové agarem, Petriho misky s Mueller-Hintonové agarem a 2% glukózou, mikrobiologické kličky (jednorázové nebo pro opakované použití), kahan, plastová brčka, sterilní plastové zkumavky, destilovaná voda, hokejky na roztírání mikrobiálních kultur, třecí miska s tloučkem, lžička, lihový fix

Materiál: čisté bakteriální kultury izolované z okolního prostředí, sýr s ušlechtilou bílou plísní, droždí, přírodní látky vybrané k testování

Časově nejnáročnější částí celého testování bylo bezpochyby plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami a aplikace vybraných přírodních látek. V předešlých dvou týdnech jsem se pokusil kultivovat jednotlivé skupiny mikrobiálních kolonií, z nichž jsem pro následující průběh testování vybral jednu bakteriální kolonii žlutého zbarvení původně izolovanou z dlaně. Abych si zajistil stoprocentní zastoupení zástupce kvasinek, izoloval jsem kulturu kvasinek z připraveného vzorku potravinářského droždí. Plísňovou kulturu, jsem izoloval z připraveného vzorku ušlechtilé bílé plísně na povrchu sýru plísňového typu z důvodu estetického i z důvodu zdravotní nezávadnosti.

6.3.1 Plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami

Ještě před samotným plošným naočkováním Petriho misek čistými kulturami jsem si nejprve číselně označil připravené Petriho misky s čistým Mueller-Hintonové agarem a Mueller-Hintonové agarem s 2% glukózou. Jelikož jsem se rozhodl testovat citlivost tří skupin mikrobiálních kultur na osm vybraných přírodních látek a tyto účinky jsem testoval dvěma metodami, pro založení pokusu bylo potřeba 48 Petriho misek. Abych tedy předešel jakékoli záměně jednotlivých Petriho misek, každou jsem označil číslicí 3 před lomítkem (označení dané série testování), následná číslice za lomítkem pak značila metodu aplikace přírodní látky a konkrétní kulturu mikroorganismů, u které jsem pozoroval citlivost na přírodní látky (viz obr. 1). Všechny Petriho misky s vybranou přírodní látkou jsem si také slovně označil, abych později jednotlivé přírodní látky lépe rozpoznal (viz obr. 14).



Obr. 14 - Ukázka označení aplikace česneku kuchyňského metodou důlkování na Petriho misku kontaminovanou kolonií ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Přenos vybraných mikrobiálních kultur jsem opět prováděl mikrobiologickou kličkou, kterou jsem používal opakovaně. Proto byla nutná její sterilizace před jednotlivými přenosy mikrobiálních kultur na připravené Petriho misky. Po celou dobu plošného naočkování Petriho misek čistými kulturami a aplikace vybraných přírodních látek jsem se také snažil mít Petriho misky co nejkratší dobu bez víka, abych zamezil nežádoucí kontaminaci.

Preparát bakteriální kultury

Pomocí sterilizované mikrobiologické kličky jsem odebral vzorek předem vybrané bakteriální kultury a rozmíchal jej ve zkumavce s přibližně jedním mililitrem destilované vody. Tím jsem získal jemně zakalenou suspenzi, kterou jsem následně rozlil po celém povrchu předem připravené Petriho misky s čistým Mueller-Hintonové agarem. Pro docílení rovnoměrného rozvrstvení suspenze na povrchu živného média jsem použil hokejku na rozetření. Pro předejití nežádoucí kontaminace jsem Petriho misku uzavřel víkem a suspenzi

nechal zaschnout. Tímto způsobem jsem připravil 16 plošně naočkováných Petriho misek bakteriální kulturou.

Preparát plísňové kultury

Pro přípravu plošně naočkováných Petriho misek kulturou ušlechtilé bílé plísně, jsem použil Petriho misky s Mueller-Hintonové agarem a 2% glukózou. Stejným způsobem, jako v případě přenosu kultury bakterií, jsem sterilizovanou mikrobiologickou kličkou odebral vzorek ušlechtilé bílé plísně z povrchu sýru a promícháním ve zkumavce s destilovanou vodou vytvořil suspenzi, kterou jsem rozlil a rovnoměrně rozetřel po celém povrchu živného média. Opět jsem si připravil 16 plošně naočkováných Petriho misek kulturou ušlechtilé bílé plísně a uzavřené víkem je nechal zaschnout.

Preparát kvasinkové kultury

V případě přípravy plošně naočkováných Petriho misek kulturou kvasinek jsem stejně jako u preparátu plísňové kultury použil Petriho misky s Mueller-Hintonové agarem a 2% glukózou. Jako tomu bylo u přípravy předešlých dvou preparátů, opět jsem sterilizovanou mikrobiologickou kličkou odebral vzorek kvasinkové kultury ze vzorku droždí, rozmícháním ve zkumavce s destilovanou vodou jsem vytvořil suspenzi, kterou jsem následně rozlil a rovnoměrně rozetřel po celém povrchu živného média. Následně jsem 16 takto vyrobených preparátů nechal uzavřené víkem zaschnout.

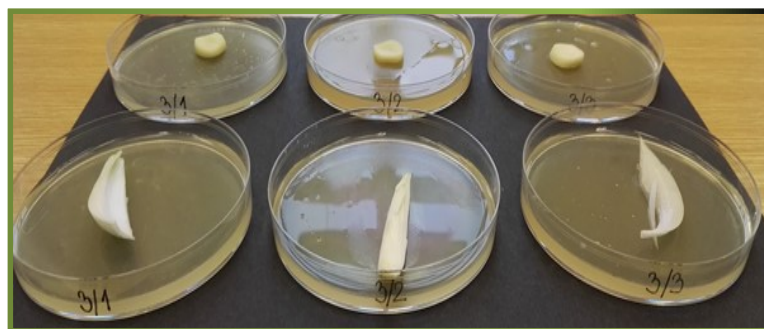
6.3.2 Aplikace vybraných přírodních látek

V úvodu praktické části této práce jsem zmínil, že jsem se rozhodl vyzkoušet dva způsoby aplikace přírodních látek – první způsob formou pokládání menších úhledně upravených kousků, druhým způsobem aplikovat vybrané přírodní látky do připravených důlků v rozmělněné formě (viz obr. 1).

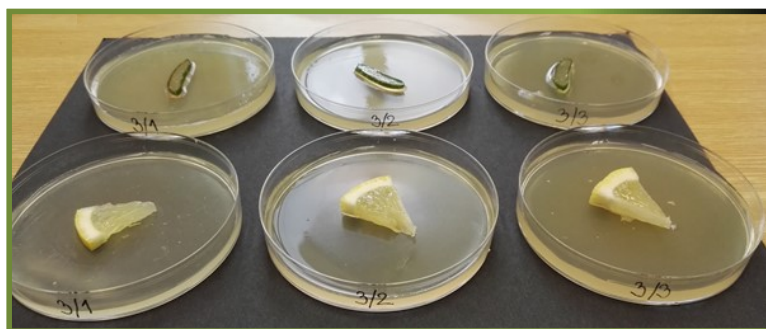
V přípravě prvního způsobu aplikace vybraných přírodních látek stačilo vybrané vzorky nakrájet nebo jinak zpracovat na úhledné menší díly. Jakmile byly plošně naočkované Petriho misky čistými kulturami suché, upravené vzorky jsem rozložil vždy přibližně do středu připravené Petriho misky a opět zavřel víkem. Metodou aplikace pokládání menších kousků tak bylo připraveno 24 Petriho misek rozdělených podle testované mikrobiální kultury na tři skupiny - kulturu bakterií, kulturu plísni a kulturu kvasinek (viz obr. 15 - 18).

Pro přípravu druhého způsobu aplikace vybraných přírodních látek bylo zapotřebí zpracovat jednotlivé přírodní látky do rozmělněné podoby. Za pomoci předem umyté třecí misky s tloučkem jsem si tedy přichystal 8 přírodních látek v rozmělněné formě. Do zbylých 24 již suchých, plošně naočkovaných Petriho misek čistými kulturami jsem pomocí brček (sterilně zabalených v papírovém obalu) vyhloubil přibližně do středu důlky. Odstranil jsem nepotřebný agar a použitím sterilní lžičky vyplnil důlky jeden po druhém vybranými přírodními látkami v rozmělněné podobě (viz obr. 19). Do každého důlku jsem se snažil aplikovat stejné množství jednotlivých přírodních látek, abych zcela zaplnil vytvořený prostor v živném médiu. Zároveň jsem chtěl ve vytvořených důlcích dosáhnout přibližně stejného množství všech vybraných přírodních látek.

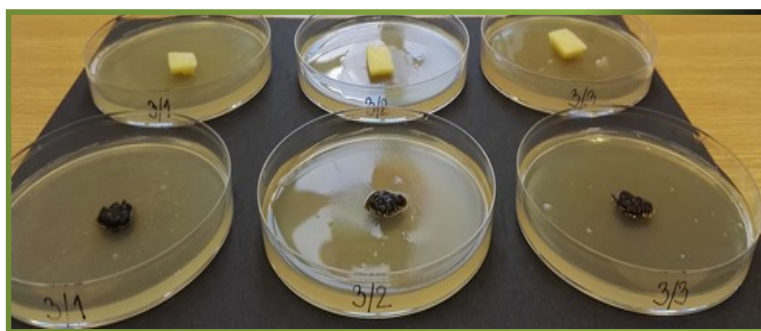
Pro testování účinnosti vybraných přírodních látek na tři vybrané mikrobiální kolonie jsem celkově připravil 48 Petriho misek, na kterých jsem agarovou difuzní metodou pozoroval jejich citlivost za použití dvou metod aplikace přírodních látek (viz obr 1). Po ukončení obou metod aplikace, jsem nachystané preparáty uschoval do krabice tentokrát dnem dolů a opět nechal růst při laboratorní teplotě v suchém prostředí.



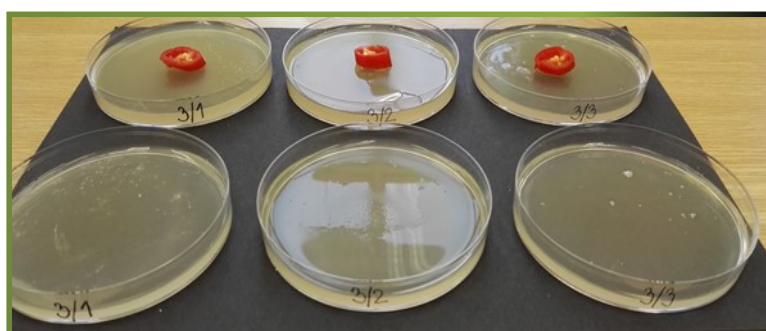
Obr. 15 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - česnek kuchyňský a cibule kuchyňská (vlastní tvorba, 2017).



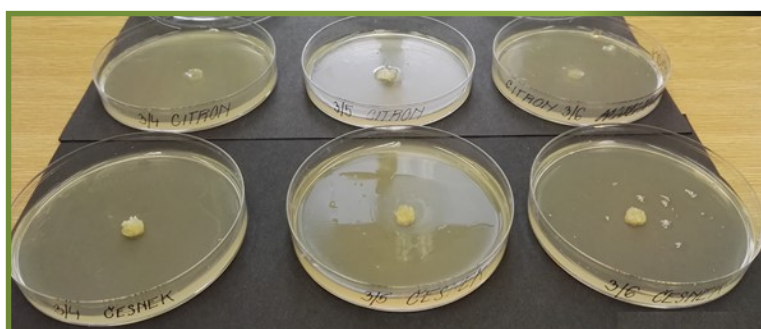
Obr. 16 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - aloe pravá a plod citronovníku (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 17 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - zázvor lékařský a tymián obecný (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 18 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - paprika setá a včelí med (vlastní tvorba, 2017).



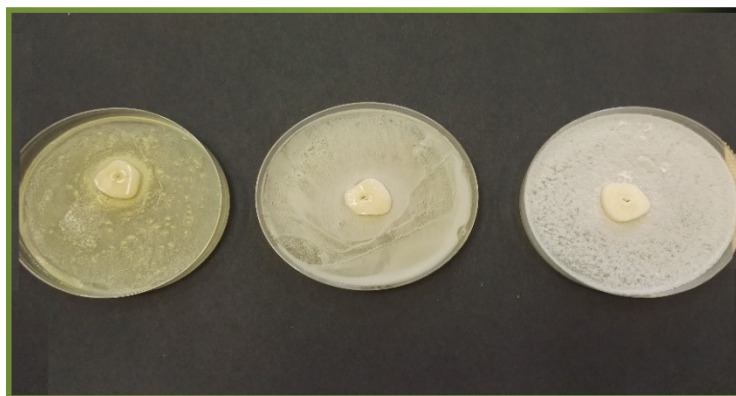
Obr. 19 - Aplikace přírodních látek metodou důlkování - česnek kuchyňský a plod citronovníku (vlastní tvorba, 2017).

6.3.3 Výsledky

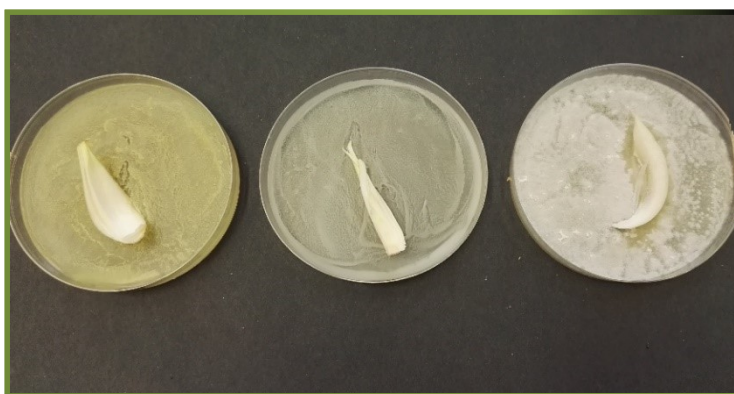
První metodou aplikace přírodních látek jsem vybrané látky v upravené podobě pokládal na plošně naočkované Petriho misky kulturou bakterií, plísní a kvasinek. Z fotografií (viz obr. 20 – 27) je vidět značný neúspěch testování zvolené metody. Ani v jednom z osmi

testovaných vzorků není výrazně pozorovatelná citlivost mikroorganismů na obsahové látky přírodnin.

Slabě pozorovatelná citlivost kolonie bakterií se jevila v případě vzorku cibule kuchyňské, česneku kuchyňského, plodu citronovníku, tymiánu obecného a zázvoru lékařského (viz obr. 28 - 32). Na přiložených fotografiích se zdá pozorovatelný náznak inhibiční zóny bakterií – v daném místě se nepatrně jeví růstová aktivita bakteriální kolonie. Jelikož jsou viditelné inhibiční zóny v těchto případech příliš malé, lze brát výsledek preparátů jako negativní. V případě testování kultury ušlechtilé bílé plísně lze určitý náznak inhibiční zóny pozorovat u cibule kuchyňské a včelího medu (viz obr. 33 - 34). Zbytek testovaných vzorků přírodních látek vykazoval naopak zvýšený nárůst kolonií plísni v jejich těsné blízkosti (viz obr. 35 - 36). Nejmenší známky účinnosti vybraných přírodních látek se projeví u testované kultury kvasinek. Náznak inhibiční zóny lze z fotografie vyčíst u testovaného vzorku včelího medu (viz obr 37). V případě vzorků aloe pravé a zázvoru lékařského se nepatrný náznak inhibiční zóny dá opět brát spíše jako negativní výsledek testování (viz obr. 38 - 39).



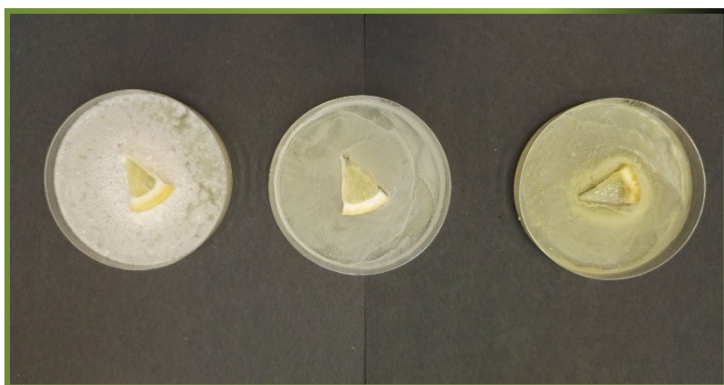
Obr. 20 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



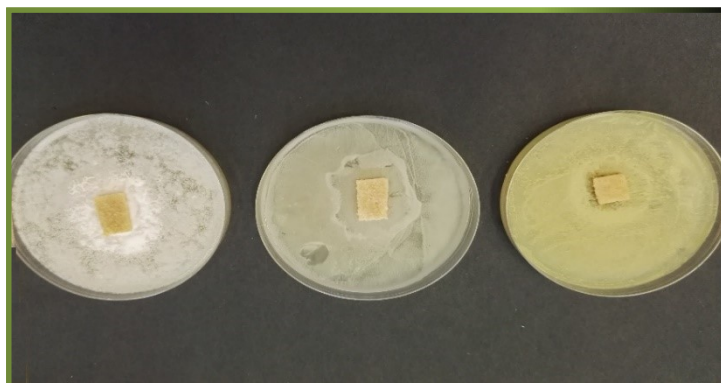
Obr. 21 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



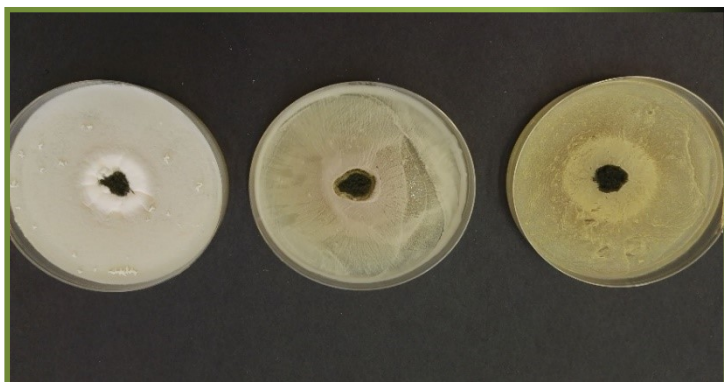
Obr. 22 - Inhibiční účinky rostliny aloe pravá aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 23 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



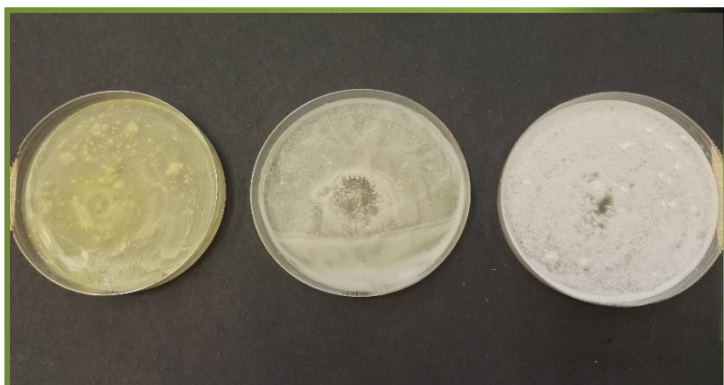
Obr. 24 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 25 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 26 - Inhibiční účinky papriky seté aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 27 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 28 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).



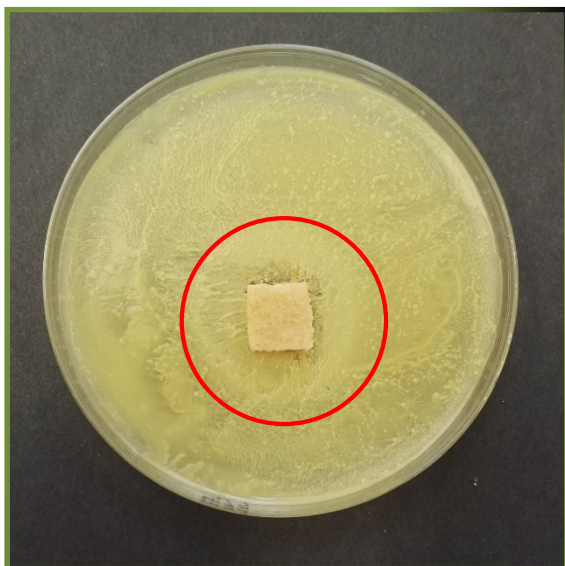
Obr. 29 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 30 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 31 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 32 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 33 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kulturou ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 34 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kulturou ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 35 Zvýšený nárůst kultury ušlechtilé bílé plísně v těsném okolí aloe pravé (vlastní tvorba, 2017).



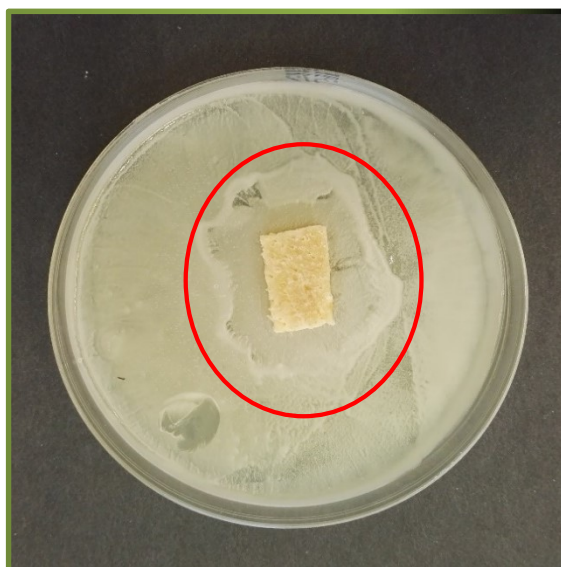
Obr. 36 - Zvýšený nárůst kultury ušlechtilé bílé plísně v těsném okolí zázvoru lékařského (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 37 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).

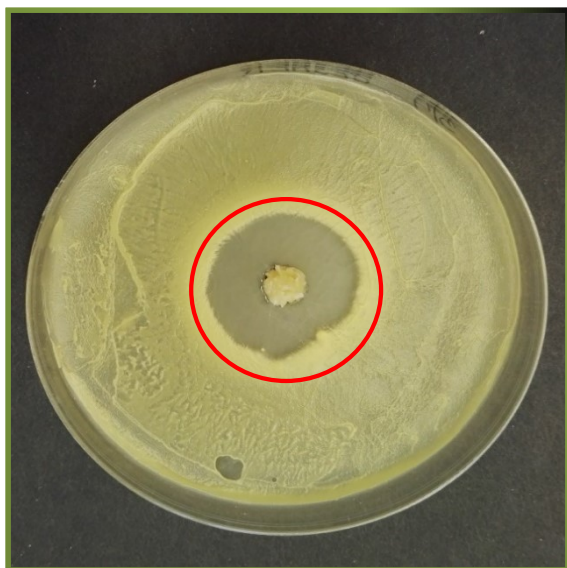


Obr. 38 - Inhibiční účinky aloe pravé aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 39 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).

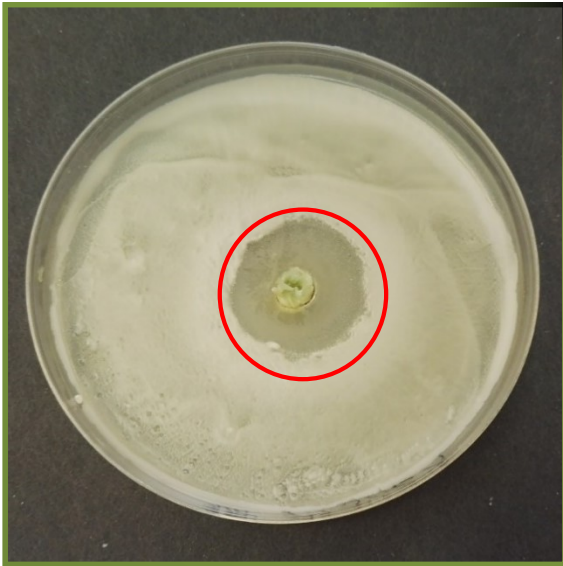
Jako druhou metodu pro testování citlivosti vybraných kultur mikroorganismů na přírodní látky, jsem zvolil aplikaci přírodních látek v rozmělněné formě. V porovnání výsledků první a druhé metody byla účinnost látek aplikovaných v rozmělněné formě do důlků daleko výraznější. Nejviditelnější účinky citlivosti mikrobiálních kultur na obsahové látky přírodnin lze pozorovat u česneku kuchyňského, plodu citronovníku a tymiánu obecného (viz obr. 40 - 48). Nejvýraznější inhibiční zóny byly v případě testování česneku kuchyňského a to v případě všech tří testovaných mikrobiálních kultur (viz obr. 40 - 42). Účinnost látek papriky seté v rozmělněné formě byla naopak nejnižší – inhibiční zóna není na fotografiích vůbec patrná (viz obr 49 - 51). Plošné naočkování Petriho misky čistou kulturou ušlechtilé bílé plísně bylo v jednom případě zřejmě chybně provedené (viz obr. 52). Z fotografie je vidět, že živné médium není plísní skoro vůbec kontaminováno a nelze tudíž ani pozorovat velikost inhibiční zóny účinných látek aloe pravé.



Obr. 40 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 41 Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



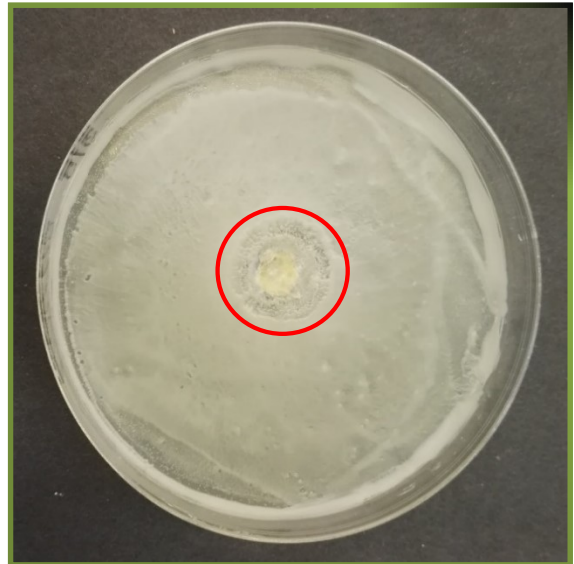
Obr. 42 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).



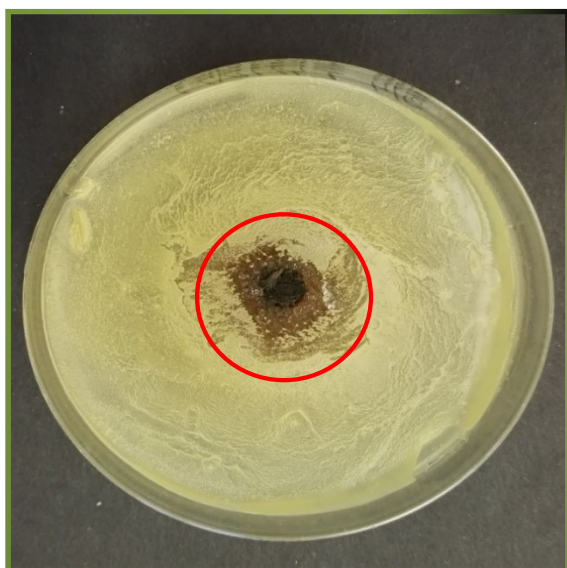
Obr. 43 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).



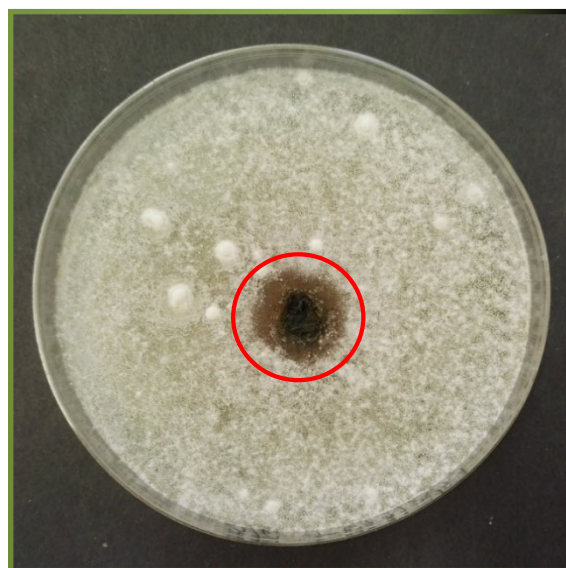
Obr. 44 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



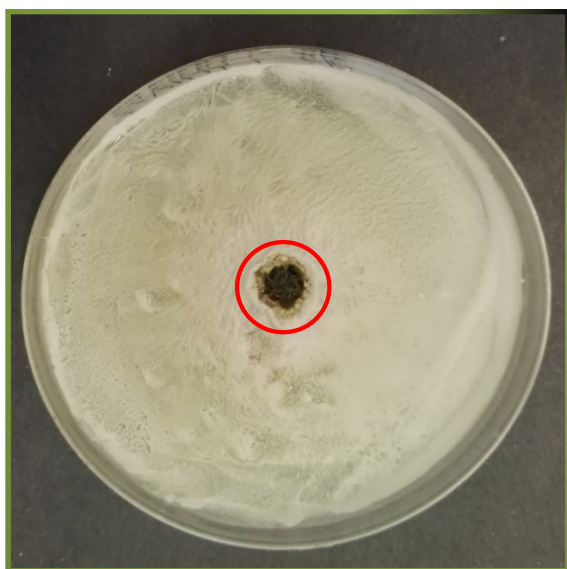
Obr. 45 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).



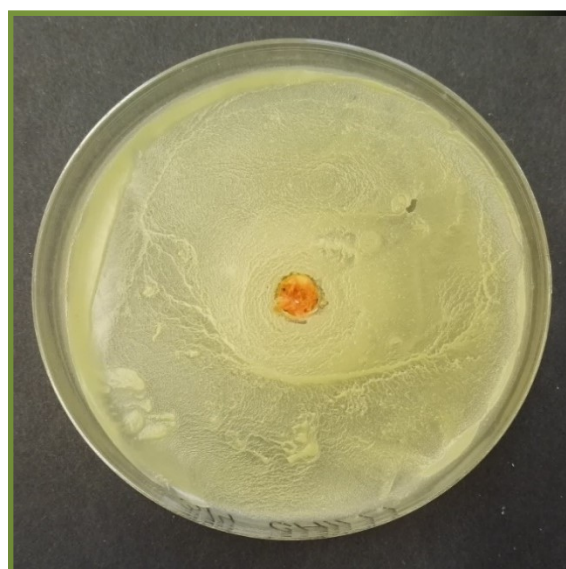
Obr. 46 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).



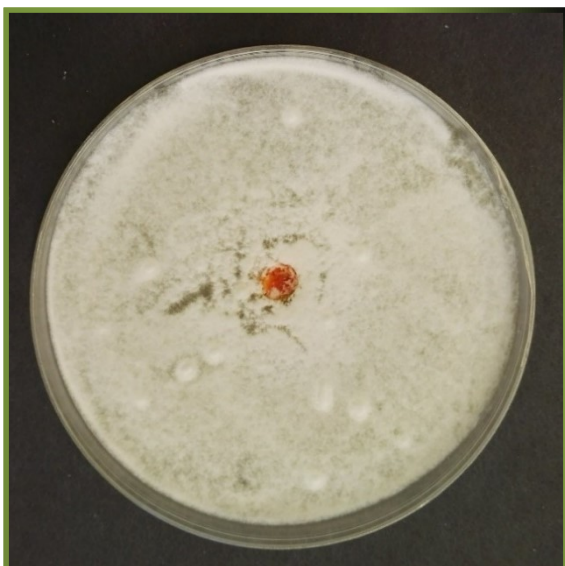
Obr. 47 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



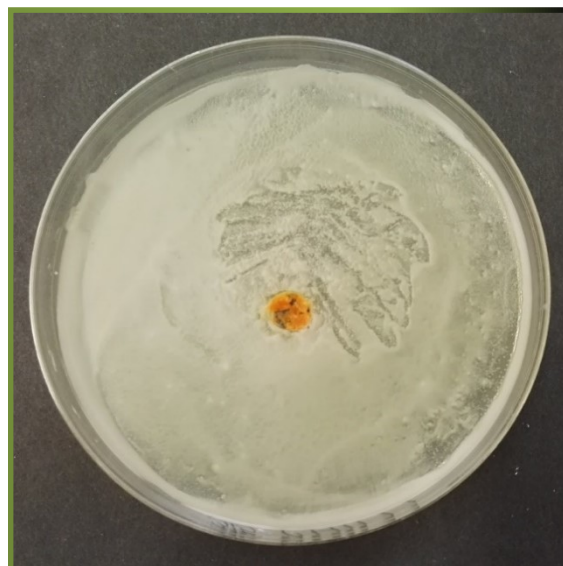
Obr. 48 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).



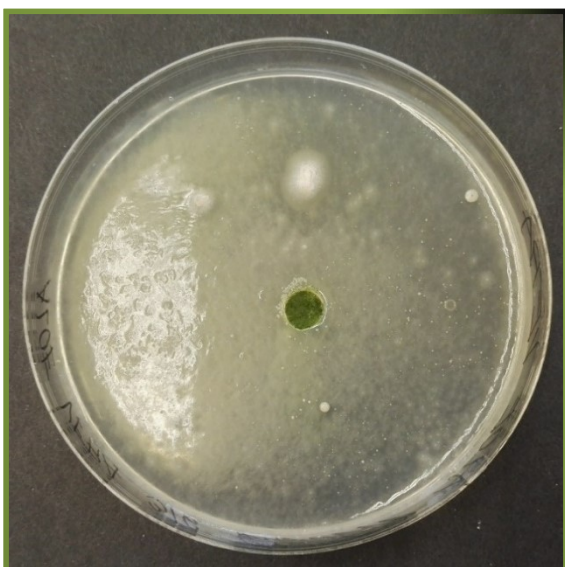
Obr. 49 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 50 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 51 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).



Obr. 52 - Chyba kontaminace Petriho misky kolonií ušlechtilé bílé plísně v případě testování účinnosti látek aloe pravé (vlastní tvorba, 2017).

7 Diskuze

Cílem testování antimikrobiálních účinků přírodních látek bylo demonstrovat možné uspořádání pokusu, který by se ve výuce mohl využít.

Z pokusu vyplývá, že by jeho proveditelnost ve školních podmínkách nebyla obtížná. K samotné přípravě testování bylo zapotřebí vybrat konkrétní druhy přírodních látek. První a druhá fáze - kultivace mikroorganismů a izolace čisté kultury - trvala každá přibližně půl hodiny. Důležitým faktorem obou částí bylo pomocí stěrů a následným přeočkováním získat dostatečné množství mikrobiálních kultur. K chybě v přenosu mikrobiální kultury došlo v takovém případě jen jednou a to při plošném naočkování Petriho misek čistou kulturou ušlechtilé bílé plísně (viz obr. 46). V ostatních případech izolace, kontaminace a přeočkování mikrobiálních kultur nedošlo při dodržování zásad práce se sterilními laboratorními pomůckami k viditelnému znehodnocení práce. Pokud bych testování prováděl znovu, použil bych pro přenos vybraných mikrobiálních kultur jednorázové (plastové) mikrobiologické kličky namísto mikrobiologické kličky pro opakované použití. Snížilo by se tak riziko nežádoucí kontaminace přenosu vybrané kultury mikroorganismů a zároveň by celková manipulace byla jednodušší a rychlejší.

Časově nejnáročnější částí bylo plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami a aplikace vybraných přírodních látek. Při zpracování osmi vybraných přírodních látek pro dvě metody aplikace působila práce poněkud chaoticky. Celkový výsledek vytvoření 48 preparátů zabral přibližně tři hodiny práce. Při opětovném testování bych proto příště vybral jen jednu metodu aplikace přírodních látek a samotné množství látek snížil. Ze dvou vybraných metod aplikace byla daleko účinnější aplikace přírodních látek v rozmělněné formě. Zřejmý neúspěch první metody byl způsoben omezenou možností difuze antimikrobiálních látek do okolního prostředí plošně naočkovaných Petriho misek. Aplikací přírodních látek v rozmělněné formě byla zajištěna mnohonásobně vyšší difuze antimikrobiálních látek.

Optimální časovou dotací bylo rozvržení průběhu testování do čtyř týdnů. Získal jsem tak mezi jednotlivými fázemi testování dostatek času pro přípravu fáze následující. Zároveň byla zajištěna doba pro možnost zopakování fáze, která by se z nějakého důvodu nevydařila.

Celý pokus bych doporučil využít ve výuce na druhém stupni základní školy v hodinách přírodopisu, pro názornou ukázkou mikroorganismů, které jsou každodenní součástí našeho života. Ukázkou testování antimikrobiálních účinků přírodních látek bych zároveň propojil s hodinami výchovy ke zdraví, kde je možné tímto způsobem demonstrovat kladné vlastnosti přírodních látek a jejich využití v případě léčby a podpory obranyschopnosti lidského organismu. Pokus je také vhodný pro hodiny biologie na střední škole, kde je samotné mikrobiologii věnováno podstatně více času, případně pro volitelné přírodovědné semináře.

8 Metodická doporučení k jednotlivým fázím pokusu

Jak již bylo zmíněno v praktické části, celé testování účinnosti antimikrobiálních látek na mikroorganismy je vhodným a hlavně aplikovatelným pokusem pro školy.

Důležitá je volba předmětu, ve kterém by měl být takový pokus demonstrován. V případě, že se jedná o druhý stupeň základní školy, lze toto testování prolnout dvěma předměty – přírodopisem a výchovou ke zdraví. V předmětu výchova ke zdraví, lze tento pokus spojit s tematickými okruhy – zdravý způsob života a péče o zdraví, rizika ohrožující zdraví a jejich prevence¹. Do těchto okruhů spadá zdravá výživa, kam lze zahrnout účinné látky v potravinách přírodního původu, jejich antimikrobiální účinky a využití těchto látek v prevenci či případné léčbě organismu. Pro žáky je následně připravena ideální možnost, ukázat si na vybraných vzorcích přírodních látek jejich účinnost. Provedení tohoto testování lze mezioborově prolnout s výukou přírodopisu. V tematických okruzích – obecná biologie a genetika, biologie člověka, probírají žáci jednotlivé skupiny mikroorganismů, jejich životní procesy a onemocnění jimi zapříčiněná. Zároveň je zde zahrnuta prevence těchto onemocnění i samotná léčba. Oba předměty lze prolnout způsobem, že první dvě fáze testování (kultivace mikroorganismů a izolace čisté kultury) by byly provedeny na hodinách přírodopisu, kde si může učitel s žáky o mikroorganismech pohovořit více, určit si na odebraných vzorcích o jaké izolované kultury by se mohlo jednat, zhodnotit úspěšnost a chyby v testování. Další fáze (plošné naočkování Petriho misek a aplikace vybraných přírodních látek) pak mohou žáci provádět v hodině výchovy ke zdraví, kde si naopak pohovoří o účincích přírodních látek, vybrané látky aplikují a posléze svá tvrzení porovnají s výsledky jejich práce.

Pokud bude zmíněné testování prováděno na střední škole, dá se v hodinách biologie zahrnout do tematických okruhů biologie bakterií, biologie hub². V průběhu probírání látky, případně po jejím dokončení, může učitel pomocí tohoto pokusu žákům ukázat různé mikrobiální kultury, průběh kultivace a přeočkování mikroorganismů a pomocí inhibičních

¹ Viz RVP ZV (2005). Dostupné z: <http://www.msmt.cz/vzdelavani/skolstvi-v-cr/skolskareforma/ramcove-vzdelavaci-programy>

² Viz RVP G (2007). Dostupné z: <http://www.msmt.cz/vzdelavani/skolstvi-v-cr/skolskareforma/ramcove-vzdelavaci-programy>

zón sílu účinnosti jednotlivých přírodních látek. V případě zájmu o rozšíření toho pokusu, může navázat na práci *Antimikrobiální účinky desinfekčních přípravků*³, ve které byly stejnou metodou testovány účinky desinfekčních přípravků běžně užívaných v domácnosti, nebo práci *Možnosti využití stanovení antimikrobiální účinnosti ústních vod v laboratorním cvičení z biologie*⁴ o účinnosti ústních vod a rezistenci bakterií na antibiotika. Pro další informace k tomuto tématu lze využít články z časopisu *Biologie-chemie-zeměpis, Testování citlivosti na antibiotika*⁵ nebo *Antibakteriální účinky ústních vod*⁶.

V průběhu příprav testování, respektive při výběru přírodních látek s antimikrobiálními účinky doporučuji výběr přírodnin s obsahovými účinnými látkami zmíněné v podkapitole 2.1 Přehled účinných přírodních látek. Dále bych také odkázal na práci *Antimikrobiální účinky přírodních látek*⁷, ve které se lze dočíst o účinnosti dalších přírodních látek při jejich testování. Pro lepší názornost antibakteriálních účinků, by mimo preparátů tvořených žáky, měl i vyučující testovat účinek alespoň jedné přírodní látky. V případě neúspěchů prací, může vyučující demonstrovat tyto účinky na své práci. Vyučující by měl klást důraz na pečlivý výběr přírodní látky, kterou bude testovat. Zvolit by měl takovou přírodní látku, u které jsou dostatečně silně viditelné inhibiční účinky. Jako vzorový případ antimikrobiálních účinků přírodní látky bych doporučil použít vzorek česneku kuchyňského. Účinky obsažných přírodních látek byly v mnou provedeném testování nejviditelnější, zároveň se jedná o látku přírodního původu obecně známou mimo jiné pro své léčebné vlastnosti. Při výběru přírodních látek žáky bych doporučil větší rozmanitost výběru. Žáky bych rozdělil na menší skupinky, případně je nechal provádět testování jednotlivě s tím, že každý z druhů přírodních látek by byl testován pouze jednou skupinou nebo jednotlivcem. Zvýší se tak rozmanitost výsledků a žáci se kolektivně dozvědí více o vlastnostech jednotlivých přírodních látek.

³ Viz *Antimikrobiální účinky desinfekčních přípravků* (Vítková, 2016). Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/76860>

⁴ Viz *Možnosti využití stanovení antimikrobiální účinnosti ústních vod v laboratorním cvičení z biologie* (Černá, 2010). Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/27403>

⁵ Viz *Testování citlivosti na antibiotika* (3/2014). Dostupné z: <http://bichez.pedf.cuni.cz/archive/2014/c3.pdf>

⁶ Viz *Antibakteriální účinky ústních vod* (5/2014). Dostupné z: <http://bichez.pedf.cuni.cz/archive/2014/c5.pdf>

⁷ Viz *Antimikrobiální účinky přírodních látek* (Sobková, 2009). Dostupné z: http://dspace.upce.cz/bitstream/handle/10195/33854/SobkovaK_Antibakterialni%20ucinky_JM_2009.pdf;jsessionid=FF8AA6D1DFB421DBC62194D1512D1A46?sequence=1

Před samotným začátkem celého testování je důležité obeznámit žáky se zásadami práce v laboratoři a bezpečností práce. Samozřejmě záleží na vybavenosti laboratoře, množství laboratorních pomůcek a materiálů, které budou používány. Přesto se může kdykoli stát, že se žák dostane do momentu, kdy bude pracovat s nepříliš bezpečným materiálem nebo laboratorní pomůckou vyžadující vyšší bezpečnost práce. Také je třeba dbát po dobu celého průběhu testování na zajištění co nejvyšší možné sterility laboratorních pomůcek a prostředí ve kterém budou pracovat. Tento pokus je koncipován pro podmínky školního prostředí, přesto pro dosažení viditelných výsledků testování je třeba se vyvarovat zbytečné kontaminaci laboratorních pomůcek mikroorganismy okolního prostředí.

Na začátku každé fáze testování je také třeba žáky seznámit s průběhem dané činnosti, jak bude vybraná část testování probíhat a které pomůcky budou zapotřebí k vytvoření hotového preparátu. Také je lepší si předem dohodnout, kolik preparátů bude každá skupina či jednotlivec vyrábět. S tím souvisí označení připravených Petriho misek s živným médiem. Pro lepší orientaci při práci doporučuji Petriho misky označit vždy na začátku každé testovací fáze.

8.1 I. fáze pokusu

V první fázi je třeba vybrat místa sběru mikrobiálních kultur. Ve výběru můžeme žákům nechat prostor, ať si sami zvolí jimi zajímavá místa pro sběr mikroorganismů. V případě míst vhodných pro odběr mikrobiálních kultur, doporučuji navrhnout plochy, které přijdou často do přímého kontaktu s lidmi (klika od dveří, displej mobilního telefonu, aj.). Díky těmto stěrům, si může vyučující s žáky ukázat, s jakými mikroorganismy se člověk dostává denně do styku. V jiném případě lze sběr mikroorganismů provést z vlastního těla (např. z dlaně). Těmito stěry mohou žáci pozorovat mikroorganismy, s kterými žijí v symbióze.

Samotná izolace mikroorganismů poté není nikterak náročná. Žáci odebrané vzorky libovolným způsobem rozetrou po povrchu Petriho misky s živným médiem. Pokud chce učitel zvýšit zájem žáků v průběhu této činnosti, lze navrhnout určitou alternativu aplikace vybraných mikrobiálních kultur na živné médium. Při samotném roztěru mikrobiologického vzorku vatovou tyčinkou, mohou žáci vytvořit různé druhy obrazců. Tyto obrazce ovšem nebudou příliš viditelné ihned po aplikaci vybraných kultur. Pokud ale bude hlídán nárůst mikrobiálních kultur, lze jednotlivá díla žáků později předložit ve viditelnější barevné

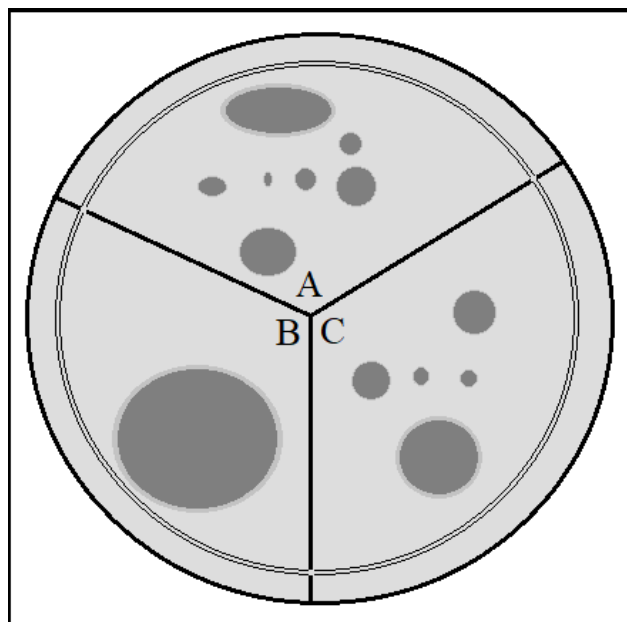
podobě. Důležité je ale hlídat růst jednotlivých mikrobiálních kolonií, aby se docílilo dostatečné kontaminace izolovaných kultur a zároveň zamezilo vzájemnému prorostení a znehodnocení vytvořených prací žáků. Jakmile jsou izolované kultury mikroorganismů rozrosteny dostatečně pro další fázi testování, stačí je pro zpomalení růstu uchovat do chladného prostředí, ideálně do lednice.

8.2 II. fáze pokusu

Před započítím druhé fáze testování je zapotřebí s žáky zhodnotit výsledky předchozí fáze. Pokud jsou preparáty povedené, měli by žáci na svých Petriho miskách pozorovat rozmanité druhy mikrobiálních kultur. V první řadě lze s žáky zhodnotit samotnou úspěšnost první fáze testování - zda se všem podařilo izolovat a vypěstovat dostatečné množství mikrobiálních kultur a v případě neúspěchu izolace si říci možné příčiny. Na vině může být špatně zvolené místo sběru, chudší na rozmanitost mikroorganismů. Další chyba mohla nastat při samotném stěru, kdy vybraný vzorek mohl být příliš malý, a proto nebyla doba jednoho týdne dostačující pro optimální rozrostení izolovaných kolonií. Dále lze s žáky porovnat jednotlivé druhy mikrobiálních kolonií. Určitě se najdou kolonie podobné barvou nebo tvarem. V takovém případě je dobré se zaměřit na místa sběru vzorků vybraná žáky. Je možná společná kontaminace, jako tomu bylo v případě dlaně a displeje mobilního telefonu jak je zmíněno ve vyhodnocení první fázi – kultivace mikroorganismů. Vyučující se také může s žáky pokusit určit, o jaké mikrobiální kultury by se mohlo jednat (bakteriální, plísňové, kvasinkové).

V úvodu druhé fáze testování si žáci vyberou jednotlivé druhy kolonií, které by chtěli použít v dalších úsecích testování. Pro zajištění rovných podmínek pro všechny v nadcházejícím průběhu testování, by se měli žáci společně dohodnout a zvolit několik nejzajímavějších druhů jednotlivých mikroorganismů pro následnou izolaci. V závěru celé práce totiž uvidí antimikrobiální účinky vybraných přírodních látek na stejné druhy mikrobiálních kultur a výsledky účinnosti látek budou díky tomu porovnatelné. Práce věnovaná účinnosti přírodních látek tak bude mít mnohonásobně větší hodnotu.

Pro přenos vybraných mikrobiálních kultur doporučuji použít jednorázové (plastové) mikrobiologické kličky namísto mikrobiologické kličky pro opakované použití. Ušetří se tak čas věnovaný opakované sterilizaci mikrobiologických kliček a zároveň se tím zajistí vyšší pravděpodobnost přenesení a kultivace čisté kultury. Pokud pro přenos mikrobiálních kultur zvolí vyučující kličku na opakované použití, proces sterilizace kličky nad kahanem by měl z hlediska bezpečnosti žáků provádět sám. Při nanášení vybraného vzorku na čisté živné médium mohou žáci opět projevit svoji kreativitu a na připravených Petriho miskách vytvořit různé obrazce. Stejně jako tomu bylo v první fázi, pokud bude nárůst čistých kultur hlídán, lze růst zpomalit ochlazením v momentu, kdy se načrtnuté obrazce zhmotní v ideální míře. Pro případ, že by bylo zapotřebí přenést větší množství čistých mikrobiálních kultur a nebyl by přichystán dostatek Petriho misek,



Obr. 53 - Petriho miska rozdělená lihovým fixem na menší úseky (vlastní tvorba, 2017).

je možno lihovým fixem rozdělit Petriho misky na menší úseky (viz obr. 53). V takovém případě je třeba neopomenout na řádné označení jednotlivých dílů, aby se později dalo určit, a kterou mikrobiální kulturu se konkrétně jedná.

8.3 III. fáze pokusu

Před začátkem třetí fáze je opět důležité neopomenout vyhodnocení předchozí fáze. Jak úspěšná byla izolace a kultivace čisté kultury. Pokud se na Petriho miskách vyskytují pouze vybrané mikrobiální kultury, pak se jedná o povedenou izolaci čisté kultury (viz obr. 8 – 13). V opačném případě, jestliže je pozorovatelné určité množství dalších mikrobiálních kultur, bylo živné médium nežádoucím způsobem kontaminované. V takovém případě je dobré říci si možné příčiny této nežádoucí kontaminace. Čisté kultury je dobré si také zhodnotit z vizuálního hlediska - zda vypěstované mikrobiální kolonie splňují očekávané požadavky

žáků. Z izolovaných čistých kultur pak vybrat ty nejzajímavější, které budou určeny pro společné sledování účinnosti antimikrobiálních látek. Ve vybraných vzorcích mikroorganismů by měla být zastoupena alespoň jedna kolonie bakteriálního, kvasinkového a plísňového původu. V případě, že by se nepodařilo izolovat některý z druhů mikrobiálních kolonií, dá se takový vzorek dodatečně opatřit (např. ušlechtilá bílá plíseň sýru, kvasinky obsažené v droždí, laktobacily z probiotik).

Třetí část testování bude pro vybranou pracovní skupinu zřejmě časově nejnáročnější. Opět je na začátku lepší si s žáky říci, co budou v této části dělat a s jakými pomůckami budou pracovat. Pro plošné naočkování Petriho misek čistými kulturami budou potřebovat mikrobiologickou kličku a zkumavku. V zájmu zvýšení plynulého průběhu práce a zajištění vyšších podmínek sterility pracovní plochy a pomůcek, doporučuji použít jednorázové mikrobiologické kličky a zkumavky z plastu. Práce žáků tak bude více samostatná a bude probíhat plynulejším tempem bez zbytečných prodlev.

V předešlé části testování byly kultivovány vybrané čisté mikrobiální kultury. V případě neúspěchu kultivace jedné z vybraných mikrobiálních kultur lze využít náhradní možnost vzorku. Vzorek kvasinkové kultury doporučuji odebrat z droždí. Plísňovou kulturu lze odebrat z různých typů sýrů s ušlechtilou plísní. Žákům takový vzorek nevádí tolik svým zápachem a hlavně působí méně nepříjemným dojmem. Navíc ve výsledném preparátu vypadá takový druh plísňové kultury vizuálně dobře. Pokud by se nepodařilo kultivovat vzorek bakteriální kultury lze využít kapslí s laktobacily dostupných v lékárně.

Pokud vyučující zvolí pro testování metodu aplikace látek důlkováním, měla by výslednou práci žáka nebo skupinky být série tří sledovaných Petriho misek (viz obr. 54). Připravené přírodní látky si žáci zpracují do rozmělněné formy nejlépe za pomoci třecí misky s tloučkem. Nanesení vzorku rozmělněné látky lze do vyhloubeného důlku provést pomocí lžičky. V případě, že skupina žáků nebo jednotlivec testují jednu přírodní látku, není třeba lžičku vyměňovat či sterilizovat. Aplikaci přírodní látky ve formě menších kousků pokládáním na živné médium nedoporučuji z důvodu vysoké pravděpodobnosti neúspěchu testování. Pokud bych měl doporučit užití této metody, tak pouze pro žáky střední školy, kde studenti mohou pozorovat, že ne každé laboratorní testování se setkává s úspěšností. Se

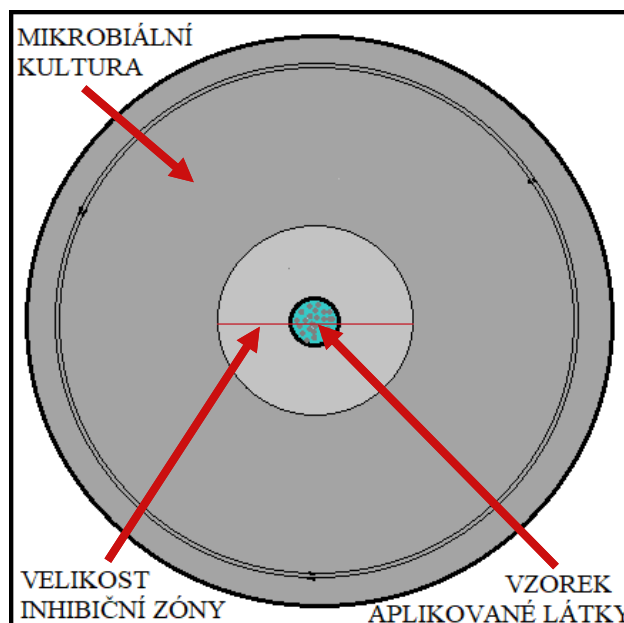
studenty lze také zhodnotit důvody neúspěšnosti této metody - omezená možnost difuze antimikrobiálních látek do okolního prostředí kontaminovaných Petriho misek.



Obr. 54 - Tři vyhotovené preparáty aplikované metodou důlkování (vlastní tvorba, 2017).

8.4 Vyhodnocení pokusu

V závěru celého testování je důležité s žáky rozebrat účinky jednotlivých přírodních látek vybraných k testování. Pokud byla poslední část testování úspěšná, měli by žáci na Petriho miskách pozorovat kultivované druhy mikrobiálních kultur. Zároveň by měly být viditelné inhibiční zóny aplikovaných přírodních látek v okolí míst aplikace (viz obr. 55). Podle velikosti inhibiční zóny lze určit sílu účinků testovaných přírodních látek. Žáci mohou změřit (např. pomocí odpichovátko a měřítka), jak velký průměr inhibiční zóny má jejich testovaná přírodní látka. Dále mohou zhodnotit své výsledky práce a účinnost testovaného vzorku s ostatními a porovnat účinnost jednotlivých vzorků. Mimo společné zhodnocení účinnosti vybraných přírodních látek doporučuji také vyhodnotit, na které mikrobiální kultuře je účinnost nejvíce viditelná. Zmínit je třeba i možné chyby v měření. Například pokud žáci na svém vzorku pozorují další mikrobiální kulturu, pak došlo během přípravy preparátu k nežádoucí kontaminaci. Dále se



Obr. 55 - Velikost inhibiční zóny aplikované přírodní látky (vlastní tvorba, 2017).

může stát, že účinnost vybrané přírodní látky bude působit tak silným dojmem, že výskyt mikrobiální kultury bude minimální, skoro žádný (viz obr. 52). Pak je třeba brát v potaz možnost špatného naočkování Petriho misky čistou kulturou.

Posledním doporučením bych chtěl nabídnout možnost využití pracovního listu připraveného k tomuto testování. Pracovní list je koncipován tak, aby žáky provedl celým průběhem testování. Po ukončení jednotlivých fází může žák zhodnotit svoji práci a zapsat očekávané výsledky fáze. V případě účinnosti vybrané přírodní látky pak může porovnat svá očekávání s výsledky jeho práce. V pracovním listu je také tabulka, kam po připravení jednotlivých preparátů ve třetí fázi testování může napsat pět podle něj nejúčinnější přírodních látek a do druhé sloupce zapsat dle výsledků testování první pět nejvíce účinných přírodních látek pro srovnání s předchozím tvrzením. Tento pracovní list dále slouží k zaznamenávání míst odběru vzorků a popisu jednotlivých vzorků pro případ, že by měl žák zájem detailněji popsat celý průběh testování. Pracovní list může také sloužit jako materiál k hodnocení celé práce. Pracovní list byl vytvořen jako podpůrný materiál pro testování na základní škole. Případná úprava pro studenty střední školy je možná.

9 Závěr

Cílem této práce bylo otestovat proveditelnost navrženého pokusu pro základní a střední školy.

Ze sesbíraných informací o účincích přírodních látek jsem vybral osm látek, jejichž antimikrobiální účinky jsem se rozhodl testovat. Účinnost vybraných látek jsem agarovou difuzní metodou ověřoval na třech izolovaných skupinách mikroorganismů - bakteriích, plísňích (vláknitých houbách) a kvasinkách. Pro testování účinnosti přírodních látek jsem zvolil dvě metody aplikace látek – aplikace pokládáním a aplikace důlkováním. Celý pokus jsem rozvrhl do čtyř týdnů, díky tomu byl mezi každou fází pokusu dostatek času na kultivaci mikroorganismů a příprav spojených s další fází.

Neúspěch viditelný v případě aplikace látek metodou pokládání byl zapříčiněn omezenou možností difuze účinných látek do okolního prostředí plošně naočkovaných Petriho misek vybranými druhy mikrobů. Výsledky aplikace přírodních látek metodou důlkování byly v porovnání s první metodou úspěšnější.

Navržený pokus byl otestován v neaseptických podmínkách školní laboratoře a výsledky prokázaly proveditelnost tohoto pokusu ve výuce.

10 Zdroje

10.1 Seznam použité literatury

BÜHRING, U. *Léčivé rostliny: obsahové látky, zpracování, základní recepty*. Praha: Knižní klub, 2010. ISBN 978-80-242-2474-9.

COWAN, M. M.. *Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews*. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 1999, 12 (4). ISSN 0893-8512.

FOSTER, B. C., ARNASON, J. T., BRIGGS, C. J. *Natural health products and drug disposition. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. California, 2005, 45. ISSN 0362-1642.

JAROŠ, Z. *Léčivé látky z rostlin*. České Budějovice: Dona, 1992.

KORBELÁŘ, J., ENDRIS Z. *Naše rostliny v lékařství*. 7. vyd. Ilustroval Jindřich KREJČA. Praha: Avicenum, 1990.

KYBAL, J. *Naše a cizí koření*. Ilustroval Jiřina KAPLICKÁ-FLOROVÁ. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).

MARÁDOVÁ, E. *Výživa a hygiena ve stravovacích službách*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola hotelová v Praze 8, 2007. ISBN 978-80-86578-69-9.

MORAVCOVA, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha: VŠCHT, 2003.

OLOWOSULU, A. K., IBRAHIM, Y. K. E. *Studies on the antimicrobial screening of aqueous extracts of five plants used in Folk medicine in Nigeria. West African Journal of Biology Sc.* 2006, 3 (5).

OPLETAL, L., TOPÍKOVÁ, J., UJER, M., LAPŤÍK, O., MORAVCOVÁ, J., DRAŠAR, P. *Přírodní látky hořké chuti, Chemické listy 101*. Praha: ČSVTS, 2007.

PAVLASOVÁ, L. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2011. ISBN 978-80-7290-536-2.

STOCKWELL, C. *Nature's pharmacy: a history of plants and healing*. London: Century, 1988. ISBN 0712618325.

STUMPF, U. *Naše léčivé rostliny: [určování a užívání]*. Praha: Ikar, 2013. ISBN 978-80-249-2207-2.

VINŠOVÁ, J., IMRANOVSKÝ, A. *Salicylanilidy - stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. Česká a slovenská farmacie*. Praha: Česká a slovenská farmacie, 2004, 53 (6).

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přeprac. vyd.* Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.

WENZEL, M. *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9.

10.2 Seznam internetových zdrojů

[1] *Bylinář: interaktivní studijní materiál o léčivých rostlinách pro žáky a učitele prvního stupně základní školy* [online]. [cit. 2018-07-13]. Dostupné z:

<http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/dp/davidova/bylinar2/>

[2] *Izolační médium pro testování antimikrobiální citlivosti* [online]. 2010 [cit. 2018-07-13]. Dostupné z: [http://www.bio-](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/Literature/inserts/56137_06_2010_CZ.pdf)

[rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/Literature/inserts/56137_06_2010_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/Literature/inserts/56137_06_2010_CZ.pdf)

11 Seznam obrázků

Obr. 1 - Vybrané dva způsoby aplikace přírodních látek na plošně naočkované Petriho misky čistými kulturami (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 2 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z dlaně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 3 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z displeje mobilního telefonu - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 4 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z displeje mobilního telefonu (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 5 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z veřejného pítka (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 6 - Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z pracovního stolu - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 7 – Kolonie mikroorganismů odebraná stěrem z veřejného pítka (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 8 - Izolovaná kolonie bakterií - bílá, poloprůhledná (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 9 - Izolovaná kolonie bakterií (bílá, poloprůhledná) - pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 10 - Izolovaná kolonie bakterií (bílá, neprůhledná) – pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 11 Izolovaná kolonie bakterií - bílá, neprůhledná (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 12 - Izolovaná kolonie bakterií - žlutá, neprůhledná (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 13 - Izolovaná kolonie bakterií (žlutá, neprůhledná) – pohled shora (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 14 - Ukázka označení aplikace česneku kuchyňského metodou důlkování na Petriho misku kontaminovanou kolonií ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 15 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - česnek kuchyňský a cibule kuchyňská (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 16 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - aloe pravá a plod citronovníku (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 17 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - zázvor lékařský a tymián obecný (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 18 - Aplikace přírodních látek metodou pokládání - paprika setá a včelí med (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 19 - Aplikace přírodních látek metodou důlkování - česnek kuchyňský a plod citronovníku (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 20 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 21 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 22 - Inhibiční účinky rostliny aloe pravá aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 23 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 24 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 25 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 26 - Inhibiční účinky papriky seté aplikované metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 27 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 28 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 29 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 30 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 31 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 32 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky bakteriální kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 33 - Inhibiční účinky cibule kuchyňské aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kulturou ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 34 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kulturou ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 35 - Zvýšený nárůst kultury ušlechtilé bílé plísně v těsném okolí aloe pravé (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 36 - Zvýšený nárůst kultury ušlechtilé bílé plísně v těsném okolí zázvoru lékařského (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 37 - Inhibiční účinky včelího medu aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 38 - Inhibiční účinky aloe pravé aplikované metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 39 - Inhibiční účinky zázvoru lékařského aplikovaného metodou pokládání na plošně naočkované Petriho misky kvasinkovou kulturou (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 40 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 41 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 42 - Inhibiční účinky česneku kuchyňského aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 43 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 44 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 45 - Inhibiční účinky plodu citronovníku aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 46 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 47 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 48 - Inhibiční účinky tymiánu obecného aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 49 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii bakterií (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 50 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii ušlechtilé bílé plísně (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 51 - Inhibiční účinky papriky seté aplikovaného metodou důlkování na kolonii kvasinek (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 52 - Chyba kontaminace Petriho misky kolonií ušlechtilé bílé plísně v případě testování účinnosti látek aloe pravé (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 53 - Petriho miska rozdělená lihovým fixem na menší úseky (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 54 - Tři vyhotovené preparáty aplikované metodou důlkování (vlastní tvorba, 2017).

Obr. 55 - Velikost inhibiční zóny aplikované přírodní látky (vlastní tvorba, 2017).

12 Seznam příloh

Příloha 1 – Návrh pracovního listu

Pracovní list

I. FÁZE POKUSU

Pomůcky:

.....

.....

Postup:

.....

.....

.....

.....

Vybraná místa sběru mikrobiálních kultur:

.....

.....

Vyhodnocení výsledků:

.....

.....

.....

II. FÁZE POKUSU

Pomůcky:

.....

.....

Postup:

.....

.....
.....
.....
Vybrané druhy mikrobiálních kultur:

.....
.....
.....
Vyhodnocení výsledků:

III. FÁZE POKUSU

Pomůcky:

.....
.....
Materiál:

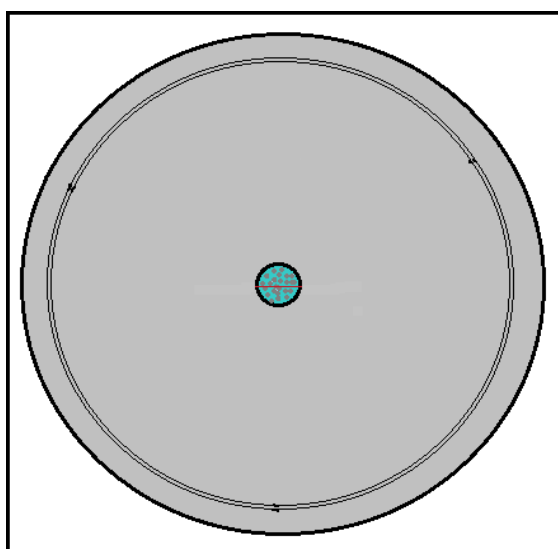
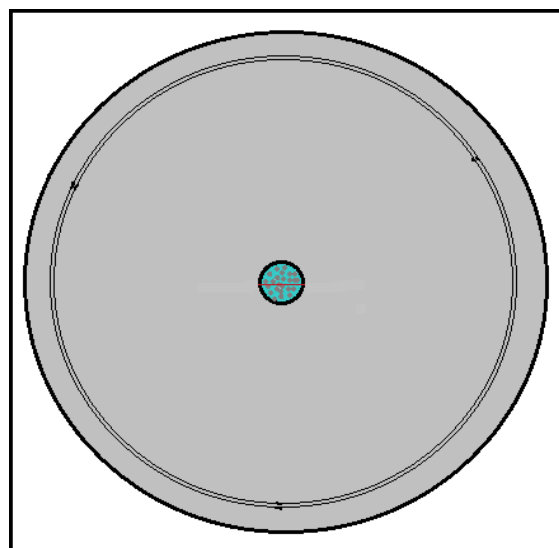
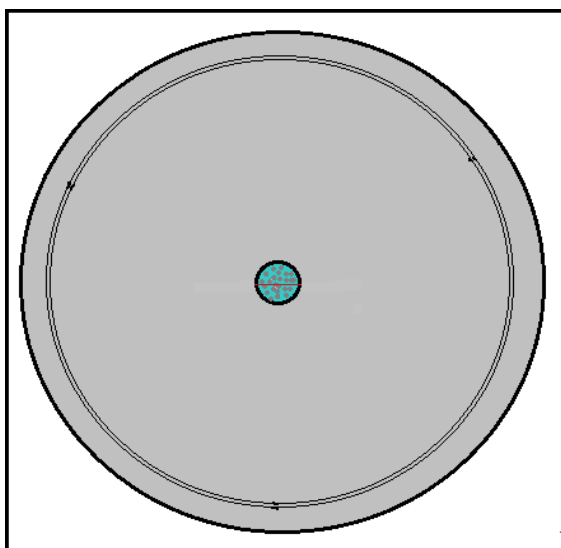
.....
.....
Postup:

.....
.....
Vybrané látky přírodního původu:

Zapiš zvolené přírodní látky a tebou předpokládanou sílu účinků těchto látek (například číslem 1 – 5). Své předpoklady nezapomeň porovnat s výsledky pokusu.

<u>Zvolené přírodní látky</u>	<u>Předpokládaná účinnost</u>	<u>Výsledná účinnost</u>

Do připravených Petriho misek zakresli sílu účinků nejúčinnější přírodní látky na vybrané druhy mikroorganismů.



Vyhodnocení testování:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....